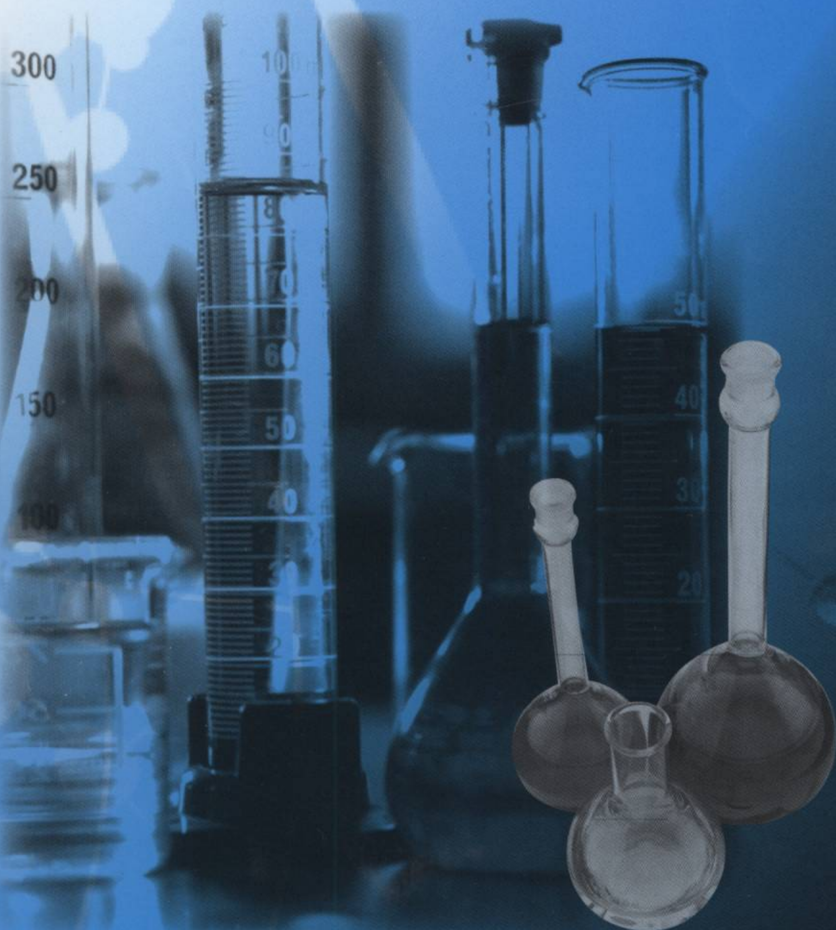
MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA
UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ
ŞI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU"

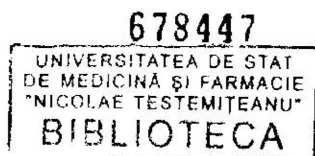
INVESTIGAȚII BIOCHIMICE

(elaborare metodică)



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA
UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"NICOLAE TESTEMIȚANU"

INVESTIGAȚII BIOCHIMICE
(elaborare metodică)



Chișinău -2008

Autori:

Valentin Gudumac, prof., dr. hab. med.,
Catedra Diagnostic de Laborator Clinic, USMF „Nicolae Testemiţanu"

Vasile Niguleanu, prof., dr. hab. med.,
Catedra Diagnostic de Laborator Clinic, USMF „Nicolae Testemiţanu"

Caragia Svetlana, dr. biol.,
Spitalul Clinic Municipal de Copii "V.Ignatenco",
Centrul Republican al Controlului Extern al Calităţii

Olga Tagadiuc, conferenţiar universitar, dr. med.,
Laboratorul Biochimie, USMF „Nicolae Testemiţanu"

Ana Varticean, asistent universitar,
Catedra Diagnostic de Laborator Clinic, USMF „Nicolae Testemiţanu"

Elaborarea metodică conţine într-o formă accesibilă date privind metodele de dozare a diferitor componente şi aprecierea rezultatelor testelor biochimice.

Lucrarea se adresează medicilor - rezidenţi, medicilor-cursanţi, specialiştilor-medici de laborator clinic, medicilor clinicieni, de la cursurile de reciclare tematică, cadrelor didactice de la colegiile de specialitate în care se predau cunoştinţe în domeniul tehnicilor de laborator.

RECENZENŢI:
Mihai Popovici, dr.hab.med, prof.universitar, academician, Institutul de cardiologie.
Minodora Mazur, dr.hab.med., prof.universitar, Catedra Medicină Internă nr.3.

Aprobat de Consiliul de experţi al MS RM
(proces verbal nr. 4 din 23 iunie 2006)

Descrierea CIP a Camerei Naţionale a Cărţii

Investigaţii biochimice : (elaborare metodică) / Valentin Gudumac, Vasile Niguleanu, Svetlana Caragia [et al.]. – Ch. : Elena-VI SRL, 2008. - 72 p.
500 ex.
ISBN 978-9975-9643-8-8

577.1(076.5)

ISBN 978-9975-9643-8-8

CUPRINS

„Omul este un compus chimic, bolile au drept cauză alterarea acestui tot..."
Paracelsius

Cuvânt înainte

Recomandările metodice de față au fost elaborate din necesitatea impusă de dezvoltarea impetuoasă pe care a cunoscut-o biochimia în ultimele decenii.

Metodele de analize biochimice în prezent cunosc o dezvoltare remarcabilă prin introducerea unor tehnici noi și aparatură de înaltă precizie. Una din achizițiile importante ale metodologiei moderne este introducerea pe scară largă în practică a kiturilor (seturilor) de reactivi care au un șir de avantaje - nu mai necesită preparare, totodată acestea economisesc timpul, sunt mai stabili, posedă un grad de sensibilitate mai înalt și au un coeficient de variabilitate mai mic, și, cel mai principal, dau rezultate mai exacte și mai precise.

De menționat, că metodele actuale care utilizează aparatură de înaltă performanță au la bază aceleași principii ca și metodele clasice. Fiecare firmă propune metodele sale de determinare, dar la baza tuturor acestor metode stau principiile care sunt descrise în aceste recomandări metodice.

Ținând cont de faptul că în laboratoarele de diagnostic clinic de rând cu cele mai noi metode de explorări cu folosirea aparaturii de investigare modernă se folosesc pe larg metodele unificate, standardizate, descrise în ordinele nr. 290, 936, 960, 1089, 1175 din fosta URSS, în recomandările metodice de față autorii au descris aceste metode clasice, în executarea cărora nu este necesară decât aparatura și reactivii accesibili, care pot fi găsiți în toate laboratoarele de specialitate și care nu și-au pierdut importanța lor, ele fiind mai puțin costisitoare. În recomandările metodice de față autorii s-au oprit la descrierea celor mai solicitate și mai importante metode, dând explicații detaliate în ceea ce privește tehnica de lucru, prepararea reactivilor și observațiile la metodele respective.

Alături de principiul și modul de lucru cu detaliile necesare, la fiecare metodă de dozare se prezintă valorile normale, variațiile fiziologice și patologice. În felul acesta, diferitele metode sunt prezentate cu tot ceea ce este necesar pentru a fi însușite de cel care le execută.

Ele corespund cerințelor actuale la pregătirea medicilor de laborator prin rezidențiat și pot fi utilizate la ciclurile de reciclare a specialiștilor în serviciul de laborator.

Capitolul 1
GENERALITĂŢI PRIVIND METODELE UNIFICATE DE CERCETĂRI BIOCHIMICE DE LABORATOR

1.1 Termeni şi definiţii

Termenii şi expresiile de mai jos se definesc după cum urmează:

a) *materialul biologic pentru cercetare* este materialul, în care se efectuează depistarea sau determinarea;

b) *eşantion* este cantitatea de material biologic adus în laborator pentru cercetare;

c) *proba de cercetat* este proba de material biologic supusă prelucrării în procesul de depistare sau determinare;

d) *proba martor* este proba supusă aceleaşi prelucrări ca şi proba de cercetat, dar care conţine:

1) aceiaşi reactivi dar fără materialul biologic (sau fără soluţia etalon);

2) material biologic diluat în acelaşi mod ca şi proba de cercetat, dar fără reactivi;

3) aceiaşi reactivi plus materialul biologic inactivat;

e) *proba de control* este proba de material de control supusă aceleaşi prelucrări ca şi proba de cercetat pentru depistarea erorilor posibile şi controlul calităţii lucrului efectuat;

g) *soluţia etalon, soluţia de calibrare* este soluţia care se foloseşte pentru construirea graficului de calibrare;

h) *proba etalon, proba de calibrare* este proba de soluţie etalon sau de calibrare supusă aceleaşi prelucrări ca şi proba de cercetat;

j) *depistare, identificare* este proba calitativă;

i) *determinare, dozare* este proba cantitativă;

k) *calcularea rezultatelor* se efectuează la determinare, dozare;

l) *aprecierea rezultatelor* se efectuează la depistare;

m) *precizia măsurării* gradul de apropiere dintre rezultatul unei măsurări şi valoarea reală a mărimii măsurate [VIM: 1993, definiţia 3.5];

n) *intervalul de referinţă* biologică intervalul central de 95 % a distribuţiei valorilor de referinţă;

NOTA 1. Acesta înlocuieşte un astfel de termen utilizat greşit precum "interval normal".

NOTA 2. Este o înţelegere arbitrară dar general acceptată de a defini intervalul de referinţă ca intervalul central de 95%. In unele cazuri particulare s-ar putea întâmpla ca altă mărime sau o configuraţie asimetrică a intervalului de referinţă să fie mai potrivită. Intervalele de referinţă (valorile „normale") reprezintă mai degrabă date obţinute statistic decât criterii de clasificare a pacienţilor în persoane bolnave şi persoane sănătoase şi se bazează pe definiţia statistică a normalului (normale fiind acele persoane la care 95% dintre investigaţii sînt în limite normale, în timp ce restul de 5% dintre examinările independente au valori aflate în afara acestor intervale de referinţă, în absenţa unei boli);

o) măsurare un set de operaţiuni ce au drept obiectiv determinarea unei valori a unei cantităţi [VIM:1993, definiţia 2.1];

p) veridicitatea măsurării gradul de corespundere dintre valoarea medie obținută dintr-o serie largă de măsurări și valoarea reală [ISO 3534 - 1:1993, definiția 3.12];

r) incertitudinea măsurării parametru asociat cu rezultatul măsurării, ce caracterizează dispersia valorilor ce intr-un mod rezonabil pot fi atribuite mărimii măsurate [VIM:1993, definiția 3.9];

s) reactivii chimici și purificarea lor. Producția chimică, denumită în general "reactivi chimici", se caracterizează printr-un grad de puritate mai înalt de cât produsele tehnice respective. Anume puritatea reactivilor chimici și determină principalele domenii de folosire în calitate de reactivi în cercetările analitice în cele mai diverse domenii ale științei și tehnicii, controlul calității proceselor tehnologice în diverse ramuri ale industriei, controlul calității producției industriale și agricole, analizelor de laborator etc.

Dacă cu 30 ani în urmă cele mai bune mostre de reactivi conțineau nu mai puțin de $1x10^{-2}$ - $1x10^{-3}$ % impurități (adaosuri) de diverse elemente, apoi în prezent se livrează materiale extra- pure, în care conținutul unor adaosuri nu depășește $1x10^{-8}$ - $1x10^{-10}$ %.

De menționat, că la fabricarea substanțelor pure conținutul impurităților, de obicei, ușor poate fi micșorat până la sutimi de procente. Purificarea de mai departe este însă o problemă cu mult mai complicată și care necesită eforturi mari.

Micșorarea cu un număr de ordine a conținutului de anumite impurități, începând cu 10^{-3} % , necesită folosirea metodelor speciale de purificare. Lucrând cu reactivii chimici trebuie de ținut cont, că micșorarea conținutului de adaosuri chiar și cu un număr de ordine conduce la creșterea bruscă (în progresie geometrică) a costului reactivului.

Pentru reactivii chimici au fost stabilite următoarele categorii de calitate: *"pur"* (чистый ,"ч"), *"puritate analitică"* (чистый для анализа, "ч.д.а."), *"puritate chimică"* (химически чистый, "х.ч.") și *"puritate deosebită"* (особо чистый, "ос.ч.") ultima la rând se divizează în câteva mărci.

Reactivii cu calitatea *"pur"* pot fi folosiți pentru diverse lucrări de laborator atât cu caracter instructiv cât și de producție.

Reactivii cu calificarea *"puritate analitică"*, după cum reiesă din denumirea lor, sunt predestinați pentru lucrările analitice de exactitate înaltă. Conținutul adaosurilor în preparatele cu puritate analitică este atât de mică, încât acestea de obicei nu pot invoca erori în rezultatele analizelor. Acești reactivi pe deplin pot fi folosiți în laboratoarele de diagnostic clinic și în cercetările științifice.

În sfârșit, reactivii cu calificarea *"puritate chimică"* , sunt predestinați pentru cercetările științifice de mare răspundere, ei se utilizează de asemenea în laboratoarele analitice în calitate de substanță pentru stabilirea titrului soluțiilor de lucru și la pregătirea soluțiilor etalon.

Aceste trei calificări includ toți reagenții de predestinație generală.

Preparatele de *"puritate deosebită"* sunt predestinate pentru scopuri speciale, când chiar şi a milionimea parte de procente de adaosuri sunt absolut inacceptabile. Principalii utilizatori a acestor reactivi sunt industria materialelor de semiconductori, radioelectronică, electronica cuantică.

În timpul cercetărilor se va ţine cont de următoarele:

a) măsurarea cu cântarul analitic se efectuează cu precizia de 0,0002g cu balanţa tehnica - cu precizia de 0,01 g;

b) pentru determinarea volumelor lichidelor şi prepararea soluţiilor se foloseşte vesela gradată ce corespunde: GOST 1770-74 pentru "cilindri, baloane cotate, pahare gradate" şi GOST 20292-74 pentru "biurete, pipete gradate";

c) în cazul când se indică temperatura "la rece", se subînţelege temperatura de 12-15^{0}C; "la cald" - temperatura de 18-20^{0}C. În cazul "fierbinte" temperatura va fi de 40-50^{0}C, iar la "fierberea pe baie de apă" se va ţine cont de temperatura de 98-100^{0}C;

d) dacă pentru soluţii nu este indicat solventul, atunci soluţiile se prepară pe apă, acestea sunt soluţii apoase;

e) sub noţiunea de "apă" fără specificări, se foloseşte apa distilată;

f) apa distilată, folosită pentru prepararea soluţiei va corespunde GOST 6709-72;

g) se folosesc reactivi chimici cu termenul de păstrare neexpirat, iar ambalajul şi condiţiile de păstrare corespund cerinţelor pentru reactivul dat, indicate pe etichetă.

Conform Sistemului Internaţional al unităţilor, concentraţia soluţiilor se exprimă în concentraţie molară (mol/l) sau concentraţie de masă (g/l).

Soluţiile folosite se prepară în volumele corespunzătoare pentru laboratorul dat, ţinând cont de stabilitatea soluţiilor şi de numărul de cercetări. Pentru majoritatea soluţiilor sunt indicate calificativele admise ale reactivilor. Când lipsesc aceste indicaţii, se vor folosi reactivi cu calificativul *"puritate chimică"*, *"puritate analitică"* sau *"pur"*.

Regulile de preparare a soluţiilor bazice sau acide sunt indicate în îndrumările pentru tehnica lucrărilor de laborator.

Prelucrarea, spălarea şi uscarea veselei de laborator se va face conform îndrumărilor corespunzătoare.

1.2 Referinţele normative

Următoarele documente la care se face referinţă sunt indispensabile pentru aplicarea recomandărilor metodice.

Ghidul 2 ISO/IEC, *Standardizarea şi activităţile conexe — Vocabular general*.

ISO 31 (toate părţile), Cantităţi şi unităţi.

ISO 9000. *Sistemele de management* al *calităţii— Bazele şi vocabularul.*

ISO/I EC 17025:1999. *Cerinţele generale faţă de competenţa laboratoarelor de testare şi calibrare.*

ISO 15189:2003(E). *Laboratoarele medicale — Cerinţele speciale faţă de calitate şi competenţă.*
Vocabular internaţional a bazelor si termenilor generali din metrologie (VIM).
GOST 3885-73. Reactivi şi substanţe deosebit de pure. Reguli de recepţionare, prelevare a probelor, împachetare, ambalare, marcare, transportul şi păstrare.
GOST 6709-72 – Вода дистиллированная (apa distilată).
GOST 4212-76 - Реактивы. Методы приготовления растворов для колориметрического и нефелометрического анализа.(Reactivi. Metodele de pregătire a soluţiilor pentru analiza colorimetrică şi nefelomertică).
GOST 4517 87 - Реактивы. Методы приготовления вспомогательных реактивов и растворов, применяемых при анализе. (Reactivi. Metodele de pregătire a reactivilor auxiliari şi a soluţiilor folosite pentru analiză).
GOST 257941-87 - Титрованные растворы (Soluţii titrate).
GOST 1770-74. Vase cotate de laborator. Cilindre, menzure, retorte, eprubete. Condiţii tehnice.
Приказ № 408 " 0 мерах по снижению заболеваемости вирусным гепатитом", М.,1989.
Информационное письмо РСЭС "О проведении комплекса санитарно-противоэпидемиологических мероприятий в клинических лабораториях лечпрофучреждений от 23.12.91 г.
Рекомендации по предупреждению инфицирования вирусом иммунодефицита человека и вирусов гепатита в КДЛ - РЦПБ СПИД, Ш,1992.
Рекомендации по отбору, хранению и транспортировке проб крови лаборатории иммунодиагностики СПИД, Кишинев,1991 г.
Instrucţiuni privind profilaxia intraspitalicească a infecţiei HIV/SIDA în practica medicală. Chişinău, 2006./ Şt.Georghiţă, E.Rotaru, N.Bordeniuc. MS şi PS al R.Moldova. Centrul Naţional şt.practic Medicină Preventivă şi Centrul SIDA. - Ch. Lumina, 2006 (Tipografia „Reclama"). 84 p.

Condiţii privind protecţia mediului ambiant:

Condiţiile privind protecţia apelor de suprafaţă contra poluării conform Regulamentului igienic "Protecţia bazinelor de apă contra poluării", aprobat de Ministerul Sănătăţii al Republicii Moldova prin ordinul nr.06.6.3.23 din 03.07.1997.
Condiţiile privind controlul emisiilor de substanţe poluante în atmosferă conform GOST 17.2.3.02 şi San PiN 4946-89 "Reguli sanitare privind protecţia aerului atmosferic în centrele populate", aprobate de Ministerul Sănătăţii al URSS la 16.05.89 şi ratificate de Ministerul Sănătăţii al Republicii Moldova la 02.07.92, nr.232..
Condiţiile privind protecţia solului contra poluării cu deşeuri menagere şi de producţie conform San PiN 42-128-4690 "Reguli sanitare privind întreţinerea teritoriilor centrelor populate", aprobate de Ministerul Sănătăţii al Republicii Moldova la 02.07.92, nr.232.

1.3 Factorii care pot influenţa asupra valorilor testelor biochimice

Un examen de laborator efectuat în timpul vieţii unui individ poate da valori diferite în funcţie de starea de sănătate sau de boală a organismului. Pentru o interpretare mai bună a analizelor de laborator trebuie să ţinem seama de factorii care pot influenţa rezultatele analizelor (tab.1.1)

Tabel 1.1

Factorii care pot influenţa rezultatele analizelor de laborator

Vârsta	Variaţiile în funcţie de vârstă sunt bine cunoscute, în primul rând trebuie sa menţionăm concentraţiile hormonilor care suferă variaţii datorită creşterii, de la nou născut la copil şi la adult. Se cunoaşte de asemenea variaţia colesterolului şi a ureei. Activitatea fosfatazei alcaline de asemenea variază în funcţie de vârstă.
Sexul	Numeroşi constituenţi plasmatici au concentraţii diferite în funcţie de sex: hemoglobina, hematocritul, fierul, cuprul, trigliceridele, etc. La femei amilaza, transferina au concentraţii mai crescute, pe când la bărbat activitatea fosfatazelor alcaline, a CPK, a transaminazelor, a ureei şi a uratului sunt mai crescute.
	Stări fiziologice deosebite
Sarcina	În timpul sarcinii pe lângă variaţiile hormonale, are loc scăderea albuminelor plasmatice, a calciului care este legat de acestea, a imunoglobulinelor, glucozei, acidului uric, hemoglobinei şi eritrocitelor, a vitaminei C. Se observă o creştere a proteinelor care transportă hormonii, a activităţii fosfatazei alcaline care creşte de două ori prin aportul fosfatazei alcaline placentare. De asemenea creşte alfa-fetoproteina, a-1-antitripsina, amilaza, beta-glucuronidaza, ceruloplasmina, leucin-aminopeptidaza. Mai cresc: colesterolul, trigliceridele, fosfaţii şi volemia. În sarcina gemelară alfa-fetoproteina este de două ori mai crescută decât în sarcina simplă.
Menopauza	În primul rând se constată modificări ale concentraţiei hormonale, care atrage după sine şi alte modificări. Astfel, în menopauză scade mai întâi progesteronul, apoi estrogenii şi mai târziu 17-cetosteroizii. Tot în menopauză creşte net activitatea fosfatazei alcaline, concentraţia plasmatică a calciului, colesterolului, a acidului uric.
Menstruaţie	În timpul menstruaţiei, pe lângă hormonii implicaţi în ciclu, apar numeroase variaţii ale aldosteronului, a CPK, aminoacizilor, colesterolului şi a magneziului.
Alimentaţia	*Alimentaţia* poate interfera dozarea colorimetrică a anumitor constituenţi datorită conţinutului lor în diverse principii, cum sunt: pigmenţii, carotenii, antocianii. *Ingestia de alimente* provoacă variaţii dificil de controlat. Astfel la două ore după o masă completă (700 cal), la subiecţii sănătoşi se observă o creştere cu 15% a concentraţiei plasmatice a glucozei, cu 15% a fosfaţilor, cu 2% a albuminelor şi proteinelor, cu 20% a AST-ului şi 6% a ALT-ului. Anumite alimente conţin serotonină, 5-hidroxi-indolacetat sau cathecolamine care pot perturba dozarea, prin metode nespecifice, a substanţelor reducătoare. Spanacul, măcrişul conţin cantităţi crescute de acid oxalic care pot interfera în dozarea calciului; un exces alimentar de sfeclă provoacă hiperaldosteronism şi hipokalemie. Cafeaua şi cofeina cresc glucoza plasmatică şi acizii graşi neesterificaţi şi scade timpul Quick.

	În postul alimentar prelungit, în afara creşterii corpilor cetonici plasmatici, creşte secreţia de aldosteron, a trigliceridelor, glicerolului, ureei, a acidului uric.
Efortul fizic	Creşte concentraţia albuminei şi a altor enzime plasmatice. Dacă efortul este intens pot creşte enzimele de origine celulară: LDH, aldoloza, creatinkinaza, AST, ALT şi chiar ornitin-carbamil-transferaza. Într-un efort de intensitate mică creşte uşor fosfatul şi proteinele plasmatice.
Stresul	Stresul este un factor important de care trebuie să se ţină cont mai ales în momentul recoltării probelor, deoarece acesta duce la creşterea concentraţiei plasmatice a trigliceridelor, colesterolului, acidului uric, glucozei, hormonului de creştere, noradrenalinei, hormonilor tiroidieni, a acizilor neesterificaţi, etc.
Ortostatismul	Proteinele serice, albuminele şi substanţele legate de proteine (colesterolul, calciul) cresc după 15 minute de stat în picioare, datorită uşoarei hipovolemii indusă de ortostatism. Aldosteronul plasmatic creşte de 5-10 ori în ortostatism faţă de poziţia culcat, la fel şi hematocritul care creşte cu 10%. În urină noradrenalina creşte de 3 ori.
Ritmurile circadiene	S-a constatat faptul că activitatea plasmatică a fosfatazei alcaline scade de la 25% până la 50% dimineaţa. Concentraţia plasmatică a aldosteronului creşte de la 6 dimineaţa pană la 3 după amiază, secreţia sa fiind mai scăzută noaptea. Probabil acest efect este datorat poziţiei ortostatice. Dar pentru aldosteronemie există un ritm circadian deoarece pentru o postură neschimbată secreţia maximă se observă la ora 8 şi minima la ora 18. Excreţia noradrenalinei este mai crescută ziua decât noaptea. Concentraţia plasmatică a fierului are un ritm circadian cu maxim după amiaza şi minim la 4 dimineaţa.
Mediul	Pesticidele, insecticidele, oxidul de carbon, vaporii de benzină, solvenţii organici, lacurile pentru păr, etc. pot da unele modificări ale examenelor de laborator cel mai adesea din cauza modificărilor toxice (citopenie, anemie hemolitică, nefrotoxicitate, afecţiuni hepatice). Astfel transaminazele, pseudocolinesteraza, bilirubina sunt crescute, iar timpul Quick şi elementele figurate sunt scăzute.
Frigul	La temperaturi scăzute cresc în plasmă catecholaminele, hormonii tiroidieni, hormonul de creştere şi leucocitele. Aminoacizii tirozina şi triptofanul plasmatic scad, pe când activitatea enzimatică a creatinkinazei creşte.
Febra	La persoanele cu febră mare s-a observat o scădere a glucozei plasmatice şi o creştere a ureei, a uraţilor urinari şi a metabolismului bazal.
Greutatea corporală	S-a constatat faptul că hemoglobina, acidul uric plasmatic, creatinina plasmatică, ALT-ul, PCE şi gama-glutamil-transferaza cresc cu masa corporală.
Fumatul	Exista diferenţe între examenele de laborator la fumători şi nefumători. Astfel, pe lângă oxihemoglobină care este crescută la fumători, mai creşte acidul ascorbic în plasmă, colesterolul, trigliceridele, glucoza plasmatică, ionul tiocian în salivă. Recent s-a demonstrat valoarea net crescută a concentraţiei de antigen carcinoembrionar la fumători faţă de nefumători (de la 3% la 19%).

Orice rezultat obţinut într-un laborator poate fi incorect datorită multor cauze, indiferent de performanţele tehnice; astfel de rezultate trebuie reverificate.

Hemoliza şi lipemia sînt cauze frecvente de rezultate eronate.

Hemoliza eliberează componentele şi enzimele eritrocitare în ser (crescând în mod caracteristic LDH seric), potasiul, fosfataza acidă şi fosfataza acidă prostatică, colesterolul [dacă hemoliza este marcată]; AST, ALT, creatinkinaza, sideremia şi magneziul pot fi afectate în mai mică măsură.

Lipemia poate determina hiponatremie, hipopotasemie, hipercloremie şi deficit anionic prin intermediul a trei mecanisme:

- turbiditatea datorată împrăştierii luminii produsă de particulele lipidice, ce interferează cu fotometria;
- erori de repartizare, care fac ca substanţa de analizat să pătrundă în faza lipidică, nonpolară, făcând-o inaccesibilă reacţiei chimice;
- lipidele înlocuiesc apa serică şi modifică distribuţia şi concentraţia electroliţilor în volumul total al probei. Aceasta nu reprezintă o problemă până când trigliceridele nu ating o valoare > 17,15 mmol/l, moment în care serul devine mai curând lăptos, decât tulbure. Sodiul seric scade cu 1,5 mmol/l pentru fiecare creştere cu 11,3 mmol/l a trigliceridelor. Fierul seric poate fi scăzut.

Chiar efectuat în circumstanţele adecvate, nici un examen nu este perfect (nu are sensibilitate, specificitate şi valoare predictivă de 100%).

Valorile sensibilităţii şi specificităţii pot fi influenţate de coexistenţa altor afecţiuni sau de prezenţa unor complicaţii sau sechele ale afecţiunii primare. În cazul majorităţii determinărilor de laborator, atât variaţiile fiziologice de scurtă durată cît şi erorile analitice sînt suficiente pentru a îngreuna interpretarea unei analize atunci când rezultatele se plasează în zona de graniţă *(borderline)*.

Intervalele de referinţă (valorile normale) variază de la un laborator la altul; orice medic trebuie să ştie că aceste intervale sînt specifice fiecărui laborator şi, de asemenea, trebuie să cunoască variaţiile legate de vârstă, sex, rasă, talie şi greutate, stare fiziologică (de exemplu, sarcină, lactaţie), pentru a le adapta fiecărui pacient în parte. Aceste valori „normale" reprezintă mai degrabă date obţinute statistic decât criterii de clasificare a pacienţilor în persoane bolnave şi persoane sănătoase şi se bazează pe definiţia statistică a normalului (normale fiind acele persoane la care 95% dintre investigaţii sînt în limite normale, în timp ce restul de 5% dintre examinările independente au valori aflate în afara acestor intervale de referinţă, în absenţa unei boli).

Cu cît rezultatul investigaţiei se îndepărtează mai mult de intervalele de referinţă, cu atât este mai probabil ca valoarea determinată să fie semnificativă clinic sau să reprezinte expresia unei afecţiuni reale. Deci, o creştere de zece ori faţă de limita superioară a normalului este mai elocventă comparativ cu o valoare doar uşor crescută faţă de normal. Cele mai multe dintre rezultatele uşor anormale se datorează unor factori pre-analitici.

Efectele *medicaţiei* administrate asupra rezultatelor investigaţiilor de laborator nu trebuie niciodată trecute cu vederea. Clinicianul trebuie să fie întotdeauna atent la regimul terapeutic urmat de pacient, la eventualele supradoze de medicamente, de vitamine şi de preparate de fier.

Variaţiile pe care le pot da medicamentele pot conduce la interpretarea greşită a examenelor de laborator şi la un diagnostic eronat.

Medicamentele pot influenta analizele de laborator sub două aspecte:

- un aspect pur analitic: medicamentele şi/sau metaboliţii acestora pot perturba sau interfera dozarea unor constituenţi biologici.

- un aspect biologic: ele pot provoca modificarea unui parametru biologic printr-un mecanism fiziologic, farmacologic sau toxicologic.

In analizele de laborator trebuie să se ţină cont de interferenţele analitice induse de medicamente, ele reprezentând aproximativ 20% din totalul interferenţelor. Medicamentele pot acţiona asupra enzimelor şi proteinelor inhibând activităţile şi proprietăţile caracteristice ale acestora. Medicamentele pot forma diferite complexe cu compuşii biologici, pot prezenta fluorescenţe proprii şi pot modifica pH-ul.

Datorita acestor interferenţe analitice ale medicamentelor trebuiesc introduse metode care să ţină cont de aceşti factori.

Adesea, pacienţii nu spun medicului ce tratamente (prescrise de alţi medici sau autoadministrate) urmează, ceea ce poate determina rezultate fals negative sau fals pozitive. Clasele de medicamente cel mai des implicate sînt anticoagulantele, anticonvulsivantele, antihipertensivele, antibioticele, antidiabeticele orale, hormonii şi substanţele psihotrope. Acestea acţionează prin unul sau mai multe mecanisme, uneori simultan (de exemplu, interferarea reacţiilor chimice din cadrul testului, lezarea unui anumit organ, precum ficatul sau rinichiul, competiţia pentru receptori, accelerarea sau întârzierea sintezei sau excreţiei unei substanţe chimice etc.).

În cazul vârstnicilor, rezultatele obţinute trebuie interpretate în lumina mai multor factori care influenţează valorile „normale" pentru această categorie populaţională:

- alterarea funcţiilor prin procesul de îmbătrânire (de exemplu, diminuarea funcţiei renale);
- prezenţa unor afecţiuni cronice degenerative care au o prevalenţă mai mare la populaţia vârstnică şi care pot fi asimptomatice sau oculte;
- prezenţa concomitentă a mai multor afecţiuni, unele putând avea efecte aditive asupra rezultatelor investigaţiilor de laborator;
- utilizarea unei medicaţii care poate influenţa rezultatele de laborator (de exemplu, între 10 şi 30% dintre persoanele în vârstă primesc diuretice);
- valorile corespunzătoare vârstei se compară întotdeauna cu cele ale adulţilor tineri de acelaşi sex, exceptând situaţiile când există alte precizări;
- atunci când sexul nu este precizat, valoarea respectivă se referă la ambele sexe.

Rezultatele negative ale investigaţiilor de laborator (sau ale altor tipuri de investigaţii) nu exclud în mod obligatoriu un diagnostic stabilit clinic.

În tabelul 1.2 sînt prezentate numai rezultatele eronate cu cea mai mare frecvenţă şi semnificaţie clinică. Acest tabel nu include discutarea efectelor medicamentelor asupra rezultatelor testelor de laborator, care sînt chiar mai numeroase, afecţiunile provocate artificial (sindromul Munchausen) sau erorile tehnice sau administrative.

Tabel 1.2

Cauzele rezultatelor de laborator eronate la efectuarea investigaţiilor biochimice şi măsurile necesare pentru identificarea acestora

Rezultat eronat	Cauzele	Măsurile necesare pentru depistarea erorilor şi corijarea rezultatelor
Scăderea glicemiei	Utilizarea *in vitro* a glucozei de către leucocite, plachete sau microorganisme[1]	Număr crescut de celule (de exemplu leucocite leucemice, eritroblaşti, reticulocite) sau microorganisme (de exemplu tripanozomiază).
Hiponatremie	Specimene recoltate distal de perfuzia cu lichid hipoton. Hiperglicemie[2] Hiperproteinemie[3]	Se determină glucoza pe aceeaşi probă; se fac recoltări repetate dintr-un alt loc. Se repetă analiza cu aparate cu electrozi specifici.
Hipernatremie	Probă de sînge ombilical recoltată prin cateter tapetat cu clorură de benzalkoniu (cationică), ce poate determina creşterea sodiului şi potasiului în cazul utilizării anumitor electrozi selectivi pentru ioni.	Potasiul seric este de asemenea crescut. Se recoltează sânge din alte locuri sau fără cateter, sau nu se utilizează metode cu electrozi ioni-selectivi
Hipopotasemie	Lipemie masivă (vezi „Hiponatremie")	
Hiperpotasemie	(a)Anemie hemolitică (b)Liză celulară in vitro a leucocitelor şi trombocitelor care sînt în număr foarte mare. (c)Garou strâns sau menţinut timp îndelungat (d)Liză eritrocitară in vitro din cauza recoltării sau manipulării incorecte a probei Probă de sânge ombilical recoltată prin cateter tapetat cu clorură de benzalkoniu cationică poate determina creşterea Na^+ şi K^+ în cazul utilizării anumitor electrozi ion-selectivi.	(a)Semnele procesului de hemoliză. (b)Număr foarte mare de leucocite sau trombocite (de exemplu > 1000.10^{12}/l; nivelul seric al potasiului este mai mare decât cel plasmatic, recoltat simultan). (c)Se compară cu proba recoltată fără garou. (d)Se repetă analiza pe un specimen corect recoltat. Sodiul seric este de asemenea crescut. Se recoltează sânge din alte locuri sau fără cateter, sau nu se utilizează metode cu electrozi ion-selectivi.
Creşterea clorului seric, deficit anionic	Hiperlipidemia produce împrăştierea luminii la analiza colorimetrică.	Hiponatremia, de asemenea, prezentă; se separă lipidele înainte de testare.
Creşterea clorului seric	Prezenţa bromurilor în ser	Test pentru bromuri serice.
Scăderea clorului seric	La fel ca pentru „Scăderea sodiului seric".	Test pentru bromuri serice.
Creşterea fosfatului seric	Mielom multiplu	Manifestări de mielom multiplu. Calciul seric şi funcţia renală pot fi normale; valori normale dacă serul este mai întâi deproteinizat.

Hiper- sau hipocalcemie	Hiper- sau hipoalbuminemie[4]	Creşterea sau scăderea albuminei sau proteinelor serice totale.
Reducerea CO_2 şi bicar-bonatului sanguin; deficit anionic marcat	(a)Efect diluţional al soluţiei de heparină sodică în proba de sânge (b)Pierderea CO_2 prin evaporare din eprubeta de recoltare poate atinge 8,8 în 2 ore. (c)Umplere deficitară a eprubetei de recoltare.	(a)Utilizarea unui sistem diferit de recoltare a sângelui. (b)Analiza promptă a probelor recoltate simultan. (c)Se repetă cu eprubete corect umplute.
Scăderea creatininei serice	În cazul anumitor analizoare, hiperbilirubinemia extremă interferă cu determinarea creatininei.	Se utilizează un aparat diferit (de exemplu Astra-8 în loc de Dupont ACA sau Abbot-VP). Ureea nu este modificată.
Creşterea creatininei serice	Acetoacetatul, în cetoacidoza diabetică, interfera cu metoda Jaffe	Ureea nu este afectată.
PO_2 crescut	Expunerea sângelui la bule de aer, în special în cazul microprobelor	Se repetă după recoltare şi transport adecvat.
Hipoxemie evidenţiată prin puls-oximetrie	Număr foarte crescut de leucocite (500 000/mm^3) sau plachete, care utilizează oxigen	Saturaţie mai mare cu oxigen, determinată prin puls-oximetrie.
Valori eronate ale O_2 şi CO_2 la puls-oximetrie	Hemoglobine anormale (carboxihemoglobină, methemoglobină); administrarea IV de albastru de metilen	Determinarea gazelor din sângele arterial; evidenţierea hemoglobinelor anormale.
Creşterea TSH, CEA, hCG sau CA-125 serice	Serul pacientului conţine anticorpi anti-şoarece (sau cei ai altui animal, cum ar fi iepurele), utilizaţi în kitul de testare	Nici o altă dovadă a unei etiologii de exemplu hipotiroidism). Adăugarea de ser de şoarece sau IgG produce valori normale ale TSH.
Scăderea creatininei urinare	Bureţii de bumbac sau mătase artificială din scutece	Se utilizează metode alternative de recoltare a urinei, sau materialul scutecelor absoarbe selectiv creatinina

Notă: CEA = antigen carcinombrionar; hCG = gonadotropina corionică umană.

[1] Chiar în cazul unui număr normal de celule sanguine, glucoza scade cu 0,4 mmol/l/oră la temperatura camerei, dacă elementele figurate sanguine nu sînt separate de ser.

[2] Efectul osmotic al hiperglicemiei scade sodiul cu 1,6 mmol/l pentru fiecare creştere a glicemiei cu 5,5 mmol/l.

[3] Acelaşi mecanism ca pentru hiperlipidemie şi efectul cationic al paraproteinelor, care înlocuiesc sodiul, scăzându-i concentraţia cu 0,7 mmol/l pentru fiecare 10 g/l de proteine monoclonale.

[4] În ser 0,8 mg de calciu se leagă de 1,0 g albumină, permiţând corectarea valorilor calcemiei. Legarea de globuline afectează numai calciul total, dacă globulinele sînt > 60 g/l. Albumina serică şi proteinele totale trebuie întotdeauna determinate simultan cu calciul.

În scopul satisfacerii necesităţilor clinice, laboratorul va determina *valorile critice* şi intervalele lor *"de alertă/critice"*, de comun acord cu clinicienii care utilizează laboratorul (tabel 1.2).

Valorile critice obţinute în urma investigaţiilor de laborator indică necesitatea unei intervenţii clinice prompte. De asemenea, orice *modificare bruscă* poate avea aceeaşi semnificaţie. Acestea mai poartă şi numele de *valori de acţiune* sau *valori de revenire automată*.

Valorile critice variază în funcţie de laboratorul care efectuează analizele respective, de vârsta pacientului, dar şi de alţi factori.

Tabel 1.2

Valorile critice ale rezultatelor cercetărilor biochimice care cer intervenţii clinice prompte

Analitul	Valorile critice	
	Nivel scăzut	**Nivel crescut**
Amoniac	Nu există	> 40 mkmol/l
Amilaza	Nu există	> 200 U/l
Bilirubina totală (nou-născuţi)	Nu există	>300 mkmol/l
Calciu	< 1,5 mmol/l	>3,2 mmol/l
Clor	< 80 mmol/l	>115 mmol/l
Creatinfosfokinaza (CFK) MB	Nu există	>5 % din activitatea totală a CFK
Creatinina (cu excepţia pacienţilor dializaţi)	Nu există	>450 mkmol/l
Fosfaţi	< 0,32 mmol/l	>145,4 mol/l
Glucoză	< 2,22 mmol/l	>27,75 mmol/l
Glucoză (nou-născuţi)	< 1,7 mmol/l	>16,65 mmol/l
Magneziu	< 0,41 mmol/l	>1,9 mmol/l
Potasiu (kaliu)	< 2,8 mmol/l	>6,2 mmol/l
Potasiu (nou-născuţi)	< 2,5 mmol/l	>8,0 mmol/l
Sodiu	< 120 mmol/l	>160 mmol/l
Troponina T cardiacă (cTnT)	Nu există	>0,1 mkg/l
Troponina I cardiacă (cTnI)	Nu există	>1,6 mkg/l
Uree(cu excepţia pacienţilor dializaţi)	0,71 mol/l	>28,6 mmol/l
Echilibrul acido-bazic (EAB) în sângele arterial sau capilar		
pO2 (adulţi)	< 40 mm Hg	Nu există
pO2 (nou-născuţi)	< 37 mm Hg (DS=7)	92 mm Hg (DS=12)
pH	< 7,2	>7,6
pCO2	< 20 mmHg	> 70 mm Hg
Bicarbonaţi	< 10 mmol/l	>40 mmol/l

Notă: DS - deviaţia Standard

În plus, medicul va fi prompt informat în oricare din următoarele cazuri:

Glicemie, recoltată a jeun	>7,2 mmol/l
Glicemie, recoltată întîmplător	>13,9 mmol/l
Colesterol seric	>7,7 mmol/l
Proteine serice totale	>90 g/l
Plumb sanguin	>Nivel crescut
Examen sumar de urină	>Puroi, sînge sau proteine > 2+

Capitolul II

METODELE DE CERCETĂRI BIOCHIMICE

2.1. Condiții generale de recoltare a materialului biologic

Procedura de colectare a materialului biologic este un moment foarte important. De exactitatea ei va depinde mersul ulterior al examenelor și deci exactitatea rezultatelor. De aceea, recoltarea va fi făcută cu multă atenție și precizie.

Fiecare laborator își rezervă dreptul de a dicta condițiile în care se vor recoltă probele.

Cel mai des în biochimia clinică sunt cercetate probele de sânge.

Recoltarea probelor de sânge se face în mod obișnuit dimineața pe nemâncate, la bolnavi odihniți; la femei este preferabil să nu fie în timpul menstruației.

Postura pacientului în timpul recoltării este importantă: se știe că decubitul dorsal timp de câteva ore crește volumul plasmatic cu 12-15%.

Schimbarea bruscă a poziției cu trecerea în ortostatism poate majora nivelele hemoglobinei, hematocritului, proteinelor totale, albuminei, colesterolului și trigliceridelor, etc; trecerea din ortostatism în decubit dorsal micșorează nivelele hematocritului, calciului, proteinelor totale și colesterolului.

În ultimul timp pentru recoltarea sângelui venos sunt utilizate sisteme de unică folosință – *vacuumuri* cu anticoagulant sau fără (eprubete și accesorii de tipul VACUETTE a diferitor firme), iar pentru prelevarea sîngelui capilar se folosesc sisteme de tipul *MiniCollect* (ex.firma „Greiner bio-one", Austria), deosebit de comode în practica pediatrică și neonatalogie (tab.2.1).

Tabel 2.1

Tipuri de vacuumuri

Culoarea capacului	**Aditiv**	**Scop**	**Precauții**	**Exemple de aplicare**
Roșu	Fără aditiv sau anticoagulant; cu gel	Permite coagularea și separarea serului	Serul trebuie separat în 45-60 min de la puncția venoasă. Se transportă în recipiente din plastic.	Biochimie, serologie, determinare grup ABO și Rh.
Surie	NaF	Inhibă procesele glicolitice	Proba poate fi păstrată pînă la 48 ore	Dozarea glucozei
Albastru	Citrat de sodiu (3,2% și 3,8 %)	Obținerea plasmei citratate	Se transportă plasma în recipiente din plastic.	Coagulologic: TP, TTPA, factorii de hemostază

Continuare tab. 2.1.

Verde	Li-heparină	Împiedică coagularea sângelui	Se transportă plasma în recipiente de plastic	Biochimic, electroliți, hormoni, gaze sanguine.
Violetă	K_4EDTA	-"-	Se transportă plasma în recipiente de plastic	Hematologie

Vacuumurile au un şir de avantaje, inclusiv:

- simplicitate, fiabilitate, siguranţă şi inofensivitate;
- nivel înalt de securitate pentru personalul medical;
- respectarea strictă a raportului sânge-reagent;
- posibilitatea folosirii eprubetelor la analizoarele biochimice, şi hematologice fără deschiderea capacelor, un lucru foarte important;
- corespunderea cerinţelor standardelor CE şi ISO privind condiţiile de sterilizare;
- adaptarea ideală pentru aplicarea în practica pediatrică şi neonatalogie etc (sistema de tipul *MiniCollect)*;
- accesorii suplimentare pentru prelevarea sângelui, cazuri speciale (pacienţi cu vene complicate), transportarea probelor şi utilizare.

Recipientele din plastic nu pot fi folosite pentru detectarea nivelelor serice ale medicamentelor, determinarea alcoolemiei sau măsurarea zincului în sânge (în aceste situaţii se preferă recipientele din sticlă).

Măsuri de precauţie pentru personalul medical:

Fiecare contact direct cu secreţiile organismului trebuie considerat a fi potenţial infectante; de aceea nu se vor atinge fără echipament de protecţie produsele din sânge!

- Pentru a reduce riscul de transmitere a infecţiilor la personalul medical sau pacienţi se vor folosi tehnici sterile şi se vor purta mănuşi de unică folosinţă, halate, măşti, ochelari de protecţie ş.a!
- Nu se vor îndoi, sparge sau scoate acele din seringa folosită fără a purta mănuşi!
- Masca trebuie purtată corect, acoperind nasul şi trebuie schimbată dacă se umezeşte!
- Instrumentele ascuţite (ex. ace, bisturiu, foarfece) trebuiesc manevrate cu prudenţă!
- Resturile biologice sau produsele cu risc de contaminare trebuiesc îndepărtate responsabil!
- Alte măsuri generale includ spălarea cu săpun antibacterian înainte şi după contactul direct cu pacientul, înainte de intervenţiile chirurgicale sau obstetricale, înainte şi după endoscopie sau alte proceduri invazive, spălarea pe mâini imediat după scoaterea mănuşilor, spălarea imediată şi atentă a tegumentelor care au fost contaminate cu sânge sau alte produse cu risc.

2.2. Determinarea proteinelor totale în serul sanguin prin metoda biuretului

Principiu. Proteinele reacționează în mediu alcalin cu sulfatul de cupru formând un compus complex de culoare roșu-violet.

Reactivi:

1. Soluție de clorură de sodiu 0,9%.
2. Soluție de NaOH 0,2 M, liberă de CO_2.
3. Reactiv biuret: 4,50 g sare Segnet se dizolvă în 40 cm^3 soluție de NaOH 0,2 M. Se adaugă 1,50 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ și 0,50 g iodură de potasiu. Se aduce la 100 cm^3 cu soluție de NaOH 0,2 M. Se păstrează într-un vas de sticlă brună. Soluția este stabilă.
4. Soluție de iodură de potasiu 0,5% în soluție de NaOH 0,2 M. Se păstrează într-un vas de sticlă brună nu mai mult de 2 săptămâni.
5. Soluție de lucru a reactivului biuret: 20 cm^3 reactiv biuret se amestecă cu 80 cm^3 soluție iodură de potasiu. Soluția este stabilă.
6. Soluție standard de albumină (din ser uman sau de bovine): 100 g/l de albumină în soluție de clorură de sodiu 0,9%; 1 cm^3 soluție conține 0,1 g de proteină.

Toți reactivii trebuie să fie de calitate analitică sau chimică și apa folosită să fie distilată, pregătită după GOST 6709-72 sau apă de puritate echivalentă.

Utilaj:

- Analizor biochimic sau fotometru electronic;
- cântar analitic cu precizia de 0,0002g;
- balanță tehnica de lucru cu precizia de 0,01 g;
- baloane cotate după GOST 1770-74 cu capacitatea 100 cm^3;
- pipetă dozator cu capacitatea $10{,}0 \pm 0{,}1$ cm^3;
- pipetă dozator cu capacitatea $1{,}0 \pm 0{,}005$ cm^3;
- pipetă dozator cu capacitatea $0{,}100 \pm 0{,}0005$ cm^3;
- cronometru cu eroarea măsurării cel mult 0,7 s, conform DN în vigoare;

Tehnica de lucru. La 0,1 cm^3 de ser se adaugă 5 cm^3 reactiv biuret de lucru, se amestecă fără să se formeze spumă. Peste 30 minute (și nu mai târziu de o oră) se citește valoarea absorbției probei față de martor la 540 nm în cuvă de 1 cm (filtru verde).

Paralel cu proba de cercetat se montează probele cu material de control (una cu conținut normal și alta - patologic); ele se prelucrează la fel ca și proba de cercetat.

Martor. La 5 cm^3 de reactiv de lucru biuret se adaugă 0,1 cm^3 soluție de clorură de sodiu 0,9%; în continuare se prelucrează ca și proba de cercetat.

Calcularea rezultatelor se efectuează după curba etalon.

Construirea curbei etalon. Din soluția stoc standard se prepară soluții standard de lucru, conform tabelei 2.2.

Tabel 2.2

Nr. d\r	Soluție standard de proteină (cm^3)	Soluție de clorură de sodiu 0,9% (cm^3)	Concentrația proteinei în g\l
1.	0.40	0.60	40.0
2.	0.60	0.40	60.0
3.	0.80	0.20	80.0
4.	1.00	-	100.0

Din fiecare diluție se ia câte 0,1 cm^3 soluție de lucru și se adaugă câte 5 cm^3 reactiv biuret de lucru, peste 30-60 min se citește valoarea absorbției, analizat față de martor.

Valori de referință: 65,0 - 85,0 g/l.

Notă:

1. Conținutul de proteină în soluția standard trebuie să fie nu mai mică de 70 g/l.
2. Când conținutul proteinei în ser depășește 100 g/l serul trebuie diluat cu soluție fiziologică, și rezultatul se înmulțește cu coeficientul de diluție.
3. Toți reactivii trebuie să fie pregătiți pe apă distilată fiartă.

2.3. Dozarea creatininei în lichidele biologice

2.3.1. Determinarea creatininei în ser și urină (metoda Popper)

Principiu. Creatinina reacționează cu acidul picric în mediu alcalin formând compuși colorați, intensitatea culorii este direct proporțională cu concentrația creatininei.

Reactivi:

1. Soluție saturată de acid picric. Acidul picric comercial are umiditatea 15-20 %, acidul nu trebuie uscat! Explozibil! 2,00 g acid picric se dizolvă în 100 cm^3 apă la încălzire în baia de apă fierbinte. După aceasta soluția se lasă pe 24 ore, periodic se amestecă. Apoi soluția se filtrează. Este stabilă. Se păstrează în vas întunecat.
2. Soluție standard stoc de creatinină (8,84 mol/l): 0,1000 g creatinină se aduce la 100 cm^3 cu soluție de acid clorhidric 0,1M. Se păstrează în frigider, în vas cu dop rodat. Pentru determinarea creatininei în ser soluția stoc se diluează cu apă distilată de 100 ori. 1 cm^3 de soluție standard de lucru conține 0,884 mmol de creatinină.
3. Soluție de hidroxid de sodiu NaOH 10 %.
4. Soluție de acid clorhidric 0,1 N.

Toți reactivii trebuie să fie de calitate analitică sau chimică și apa folosită să fie distilată, pregătită după GOST 6709-72 sau apă de puritate echivalentă.

Utilaj:

- analizor biochimic sau fotometru electronic;
- cântar analitic cu precizia de 0,0002g;
- balanță Tehnica de lucru cu precizia de 0,01 g;
- baloane cotate cu volumul 100 ± 0,1 cm^3 ;
- pipetă dozator cu capacitatea 10,0 ± 0,1 cm^3 ;
- pipetă dozator cu capacitatea 1,0 ± 0,005 cm^3 ;
- pipetă dozator cu capacitatea 0,100 ± 0,0005 cm^3;
- cronometru cu eroarea măsurării cel mult 0,7 s, conform DN în vigoare;
- baie de apă.

Tehnica de lucru. Determinarea creatininei în ser: 2,0 cm^3 ser se amestecă cu 6,0 cm^3 soluție saturată de acid picric. După 5 minute eprubeta se introduce în baia de apă clocotindă timp de 15-20 secunde, apoi se centrifughează.

La 4,0 cm^3 de supernatant se adaugă 0,2 cm^3 hidroxid de sodiu (NaOH) 10% și se agită foarte bine. Câte odată după alcalinizare soluția se tulbură din cauza precipitării fosfaților. În așa caz soluția trebuie încă o dată centrifugată. Apoi soluția se aduce la 10 cm^3 cu apă distilată.

După 10 minute se citește valoarea absorbției în cuvă de 20 mm, la 540 nm (filtru verde) față de martor.

Paralel cu proba de cercetat se montează probele cu material de control (una cu conținut normal și alta - patologic); ele se prelucrează la fel ca și proba de cercetat.

Tabel 2.4

Nr d/o	Sol. standard de lucru de creatinină (cm^3)	Sol. acid picric (cm^3)	Sol. NaOH 10% (cm^3)	Apă dist.	Conținutul de creatinină în probă (μmol)	Concentrația de creatinină în serul sanguin (μmol/l)
1.	0,4	3,0	0,2	Până la 10 cm^3	0,03536	35,4
2.	0,8	3,0	0,2		0,07072	70,7
3.	1,6	3,0	0,2		0,14144	141,4
4.	2,4	3,0	0,2		0,21216	212,2
5.	3,2	3,0	0,2		0,28288	282,9

Martorul: 3 cm^3 soluție saturată de acid picric și 0,2 cm^3 soluție de NaOH 10% se aduce la 10 cm^3 cu apă distilată.

Calcularea rezultatelor se face după curba etalon.

Construirea curbei etalon. Din soluția standard de lucru de creatinină se prepară diluții după tabelul 2.4.

După 10 minute se citește în acelea valoarea absorbției și condiții ca și probele.

Determinarea creatininei în urină. Într-un balon cotat de 100 cm^3 se pipetează 0,5 cm^3 urină (din 24 de ore) și 3,0 cm^3 soluție acid picric. Amestecul se agită foarte bine și se adaugă 0,2 cm^3 NaOH 10%. Se lasă la temperatura camerei 10 minute. Apoi se aduce la 100 cm^3 cu apă distilată. Se citește, în cuve d valoarea absorbției e 10 mm la 540 nm (filtru verde) față de martor.

Martorul: 3,0 cm^3 acid picric și 0,2 cm^3 NaOH 10%, se aduc la 100 cm^3 cu apă distilată.

Proba standard. La 0,5 cm^3 soluție stoc standard (4,42 μmol creatinină) se adaugă 3 cm^3 soluție acid picric și 0,2 cm^3 NaOH 10%. Proba standard se tratează similar ca și probele de analizat.

Calcularea rezultatelor se efectuează după formula:

$X = \frac{Cst \cdot Apr \cdot a}{Ast \cdot b}$, unde

x - cantitatea de creatinină în urina din 24 ore (mol);

Cst - cantitatea de creatinină în proba standard (mol);

Apr - valoarea absorbției probei de analizat;

Ast - valoarea absorbției probei standard;

a - cantitatea urinei din 24 de ore;

b - cantitatea urinei ce se ia pentru analiză.

Valori de referință: Creatinina serică: femei - 44,2 – 88,4 mmol/l;
bărbați - 44,2 101,7 mmol/l.
Creatinina în urina din 24 de ore - 4,42 – 19,53 mmol/l.

Notă:

1. Dacă concentrația creatininei în ser este mai înaltă de 350 mmol/l, atunci serul se diluează cu soluție fiziologică, iar rezultatul obținut se înmulțește cu factorul de diluție.

2. Absorbția se citește nu mai târziu de 20 min după adăugarea hidroxidului de sodiu (NaOH).

3. În calitate de conservanți pentru urină se folosesc toluen și timol, care nu împiedică determinarea creatininei.

4. Proteina nu împiedică determinarea creatininei până la concentrația de 1,5 g/l de urină. Dacă cantitatea de proteină este mai mare, atunci ea trebuie să fie înlăturată până la efectuarea analizei.

5. La determinarea creatininei în urină, începând cu absorbția 0,22-0,25, urina trebuie diluată, iar rezultatele se înmulțesc cu factorul de diluție.

2.3.2. Micrometoda de determinare a creatininei în ser şi urină

Principiul metodei de dozare a creatininei în lichidele biologice (serul sanguin, urină) se bazează pe reacţia de culoare Jaffe cu sedimentarea proteinelor serului sanguin în prezenţa acidului tricloracetic. La interacţiunea creatininei cu picratul de sodiu se formează un compus de culoare roşu-oranj, intensitatea căruia este direct proporţională cu concentraţia creatininei. Intensitatea coloraţiei după metoda dată aproape de trei ori depăşeşte intensitatea coloraţiei primită prin metoda Popper clasică, cantitatea de acid picric cheltuit se reduce de 25 de ori, iar cantitatea serului sanguin se reduce de 4 ori. Pentru fiecare serie de măsurări este suficient de a utiliza o probă de control şi una standard.

Reactivi:

1. Soluţie de acid picric 35 mmol/l: 8,00 g de acid picric se dizolvă în 1000 cm^3 de apă distilată, se filtrează. Se păstrează în veselă din sticlă brună. Reactivul este stabil.

2. Soluţie de hidroxid de sodiu 1,6 mol/l: 64,00 g NaOH (puritate chimică sau analitică) se dizolvă în 1000 cm3 de apă distilată proaspăt pregătită. Se păstrează în veselă din masă plastică.

3. Soluţie HCl 0,1 mol/l.

4. Mediul de reacţie proaspăt pregătită: se amestecă o parte sol. de acid picric 35 mol/l cu o parte de soluţie de NaOH 1,6 mol/l (1:1). Reactivul este stabil la 20 - 25°C la păstrarea în vas din sticlă întunecată în decurs de 5 ore.

5. Sol. de acid tricloracetic (TCA) 0,12 mol/l (sol. 20%);

6. Soluţie de clorură de sodiu 0,9%;

7. Soluţie standard stoc de creatinină 10 mmol/l: 0,1132 g de creatinină se dizolvă în 100 cm^3 de HCl 0,1mol/l. În 1,0 cm^3 soluţie standard stoc se conţine 10 μmol de creatinină. Se păstrează la frigider.

8. Soluţie standard de lucru de creatinină 100 μmol/l: 1 cm^3 de soluţie de creatinină stoc se dizolvă de 100 ori cu apă distilată. În 1,0 cm^3 de soluţie standard de lucru se conţine 1 μmol de creatinină. Soluţia este instabilă.

Toţi reactivii trebuie să fie de calitate analitică sau chimică şi apa folosită să fie distilată, pregătită după GOST 6709-72 sau apă de puritate echivalentă.

Utilaj:

- analizor biochimic sau fotometru electronic;
- cântar analitic cu precizia de 0,0002g;
- balanţă Tehnica de lucru cu precizia de 0,01 g;
- baloane cotate cu volumul 100 ± 0,1 cm^3 ;
- pipetă dozator cu capacitatea 10,0 ± 0,1 cm^3 ;
- pipetă dozator cu capacitatea 1,0 ± 0,005 cm^3 ;
- pipetă dozator cu capacitatea 0,100 ± 0,0005 cm^3;
- cronometru cu eroarea măsurării cel mult 0,7 s, conform DN în vigoare;
- baie de apă.

Tehnica de lucru: Se foloseşte numai serul proaspăt şi nehemolizat. Serul poate fi păstrat nu mai mult de 24 de ore la temperatura +4°C.

Urina pentru cercetare se foloseşte diluată cu apă distilată de 50 sau 100 ori (1 parte de urină se dizolvă respectiv cu 49 sau 99 părţi de apă distilată). În cazul prezenţei în urină a cantităţilor considerabile de substanţe reducătoare, ele pot fi parţial înlăturate prin expunerea termică a urinei până la fierbere.

În 4 eprubete de centrifugare se adaugă:

- în prima - 0,5 cm^3 ser sanguin;
- în a doua - 0,5 cm^3 urină diluată de 50 sau 100 ori;
- în a treia - 0,5 cm^3 soluţie standard de lucru de creatinină (proba etalon);
- în a patra - 0,5 cm^3 apă distilată (proba martor).

În fiecare probă se adaugă câte 0,5 cm^3 de acid tricloracetic 1,2M şi conţinutul eprubetelor se agită viguros.

Probele cu ser se centrifughează 10 min la 3000 turaţii/min, ulterior supernatantul transparent se colectează cu atenţie într-o eprubetă cotată uscată şi se completează volumul cu apă până la 1,0 cm^3. Probele cu urină, precum şi probele etalon şi martor nu se centrifughează. Apoi în fiecare eprubetă se adaugă câte 1,0 cm^3 mediu de reacţie ce conţine acid picric 3,5 M şi soluţie de NaOH 1,6 M în raport de 1:1, pregătit extempore. Se amestecă minuţios şi se expune timp de 20 min la 25 ^{0}C. Măsurarea absorbţiei probei experimentale şi etalon se efectuează la fotoelectrocolorimetru contra probei martor în cuve de 5 mm la 490 nm. Dacă valoarea absorbţiei probelor experimentale depăşeşte 0,5 - 0,6, atunci serul sau urina diluată se amestecă în raport 1:4 cu soluţie de NaCl 0,9% şi se repetă măsurarea. În acest caz rezultatul se înmulţeşte la 5. Reacţia este sensibilă la acţiunea temperaturii, de aceea trebuie menţinută temperatura de 25°C.

Calcularea rezultatelor concentraţiei creatininei se efectuează după curba etalon sau formulele:

- în serul sanguin: $C\mu mol/l - \frac{Apr}{Ast} \cdot 100;$
- în urină: $C\, mmol/l = \frac{Apr}{Ast} \cdot 5;$
- în urina din 24 ore: $C\, mmol/24h = \frac{Apr \cdot 5 \cdot D}{Ast};$

unde: *Apr* - densitatea optică a probei experimentale;

Ast - densitatea optică a probei etalon;

D - volumul urinei în 24 ore (în litri).

Prin metoda dată este posibilă la fel determinarea concomitentă a creatininei în serul sanguin şi urină, iar în caz de calculare a minut diurezei se poate determina şi clearence-ul creatininei, adică starea funcţională a rinichilor - filtraţia glomerulară:

Clearence-ul creatininei (cm^3 /min) = $\frac{Ucr \cdot V}{Pcr}$; unde

Ucr - concentraţia creatininei în urină (mmol/l);
Pcr - concentraţia creatininei în ser (mmol/l);
V - minut diureza (cm^3 /min).

Valorile de referinţă ale concentraţiei de creatinină în serul sanguin: bărbaţi - 53-97 µmol/l, femei - 44-80 µmol/l. În urină: 8,8-13,2 mmol/24 ore.

Valorile de referinţă ale clearence-ului creatininei:
bărbaţi: 98 - 156 cm^3 /min (1,6 - 2,6 cm^3 /sec)
femei: 95 - 160 cm^3 /min (1,6 - 2,7 cm^3 /sec).

2.4. Testul cu timol

Principiu. La interacţiunea serului sanguin cu sistemul tampon timol-veronal apare o turbiditate în urma formării complexului globulino-timolo-lipidic.

Reactivi:

1. Soluţie alcoolică de timol 10% : 10,00 g de timol purificat se dizolvă în alcool etilic 96^0 în balon cotat de 100 cm^3.

Purificarea timolului: 100,00 g timol se dizolvă în 100 cm^3 de alcool etilic 96^0, se filtrează. La filtrat se adaugă 1 l de apă distilată rece, se agită puternic şi se lasă pe 20 minute. Se filtrează, cristalele rămase pe filtru se spală de 2 ori cu apă distilată rece, se usucă la început pe hârtie de filtru, pe urmă timp de 2-3 zile în exicator de asupra clorurii de calciu anhidre până la o greutate constantă.

2. Soluţia tampon: 2,76 g veronal (exact) şi 2,06 g medinal (veronal de sodiu) se aduc la 1l cu apă distilată. Se păstrează în frigider, la apariţia sedimentului reactivul nu este bun pentru întrebuinţare.

3. Soluţia tampon veronal-timol, pH 7,55-7,60. Într-un balon cotat de 100 cm^3 se amestecă 80 cm^3 soluţie tampon şi 1,0 cm^3 soluţie alcoolică de timol, se agită şi se adaugă soluţie tampon până la cotă. Se controlează pH-ul.

4. Soluţia standard:

a) Soluţie de clorură de bariu: 1,75 g clorură de bariu ($BaCl_2 \cdot 2H_20$) se aduc la 100 cm^3 cu apă distilată.

b) Acid sulfuric 0,2 N.

Suspensia de sulfat de bariu: 3 cm^3 soluţie de clorură de bariu se introduc în balon cotat de 100 cm^3. Se aduce la cotă cu H_2SO_4 0,2 N la temperatura de +10^{0}C (la această temperatură dimensiunile particulelor de sulfat de bariu precipitat dau relativ un rezultat stabil). Suspensia de sulfat de bariu se pregăteşte *ex tempore*.

Toţi reactivii trebuie să fie de calitate analitică sau chimică şi apa folosită să fie distilată, pregătită după GOST 6709-72 sau apă de puritate echivalentă.

Utilaj:
- analizor biochimic sau fotometru electronic;
- cântar analitic cu precizia de 0,0002g;
- balanță tehnică de lucru cu precizia de 0,01 g;
- baloane cotate cu volumul 100 ± 0,1 cm^3 ;
- pipetă dozator cu capacitatea 10,0 ± 0,1 cm^3 ;
- pipetă dozator cu capacitatea 1,0 ± 0,005 cm^3 ;
- pipetă dozator cu capacitatea 0,100 ± 0,0005 cm^3;
- cronometru cu eroarea măsurării cel mult 0,7 s, conform DN în vigoare;

Tehnica de lucru. La 6 cm^3 de soluție tampon veronal-timol se adaugă 0,1 cm^3 ser, se lasă pe 30 minute la temperatura camerei și se citește absorbția la 630-690 nm (filtru roșu) față de martor, în cuve de 1 cm. Reacția se efectuează la temperatura camerei.

Paralel cu proba de cercetat se montează probele cu material de control (una cu conținut normal și alta - patologic); ele se prelucrează la fel ca și proba de cercetat.

Calcularea rezultatelor se efectuează după curba de etalonare.

Construirea curbei etalon. Din soluția standard de sulfat de bariu (suspensie) se prepară diluții care corespund unităților de turbiditate după Shank și Hoagland (S-H) conform tabelului 2.5.

Tabel 2.5

Nr. d/r	Suspensia de $BaSO_4$ (cm^3)	Sol.H_2SO_4 0,2N (cm^3)	Unități de turbiditate (S-H)
1.	1,35	4,65	5
2.	2,70	3,30	10
3.	5,40	0,60	20

Soluțiile standard se amestecă, se agită bine și îndată se citește valoarea absorbției la 630-690 nm (filtru roșu) în cuve de 1 cm față de apă.

Valori de referință - 0 - 4 unități (S-H)

2.5. Determinarea bilirubinei în ser după Jendrassik, Cleghorn și Grof

Principiu. La interacțiunea acidului sulfanilic cu nitritul de sodiu se formează acidul diazofenilsulfonic, care cu bilirubina directă din serul sanguin dă o culoare roz-violetă. După intensitatea culorii se determină concentrația bilirubinei directe. După adăugare la ser a reactivului cofeinic bilirubina indirectă trece în stare solubilă disociată și cu amestecul de diazoreactiv dă o culoare roz-violetă. După intensitatea culorii se determină concentrația bilirubinei totale. După diferența dintre bilirubina totală și directă se determină concentrația bilirubinei indirecte.

Reactivi:

1. Reactivul cafeinic: 5,00 g cofeină, 7,50 g benzoat de sodiu, 12,50 g acetat de sodiu ($C_2H_3O_2Na_3$ H_2O) se dizolvă în 90 cm^3 apă distilată, se încălzește la 50-60^0, se agită bine. Se adaugă apă distilată până la 100 cm^3. Timpul păstrării - 2 săptămâni.

2. Sol. clorură de sodiu 0,9%.

3. Diazoamestec :

a) Diazoreactiv I: 5,00 g acid sulfanilic se dizolvă prin încălzire în 300-400 cm^3 apă distilată, se adaugă 15 cm^3 acid clorhidric concentrat cu greutatea specifică 1,19. Dacă acidul sulfanilic nu se dizolvă complet balonul se pune în apă caldă și se agită permanent. Numai după dizolvarea completă a acidului sulfanilic se adaugă apă până la 1 l. Reactivul e stabil. Se păstrează în vas de sticlă brună;

b) Diazoreactiv II: soluție nitrat de sodiu ($NaNO_2$) 0,5%. Reactivul se păstrează în vas de sticlă brună 2-3 săptămâni. Primul semn de inutilizabilitate este apariția unei nuanțe gălbui. Înainte de lucru se amestecă 10 cm^3 de diazoreactiv I și 0,3 cm^3 de diazoreactiv II.

Toți reactivii trebuie să fie de calitate analitică sau chimică și apa folosită să fie distilată, pregătită după GOST 6709-72 sau apă de puritate echivalentă.

Utilaj:

- analizor biochimic sau fotometru electronic;
- cântar analitic cu precizia de 0,0002g;
- balanță tehnică de lucru cu precizia de 0,01 g;
- baloane cotate cu volumul 100 ± 0,1 și 1000± 0,5 cm^3;
- pipetă dozator cu capacitatea 10,0 ± 0,1 cm^3;
- pipetă dozator cu capacitatea 1,0 ± 0,005 cm^3;
- pipetă dozator cu capacitatea 0,100 ± 0,0005 cm^3;
- cronometru cu eroarea măsurării cel mult 0,7 s, conform DN în vigoare;

Tehnica de lucru. În 3 eprubete (pentru bilirubina totală, directă și martor) se introduc reactivi conform tabelului 2.6:

Tabel 2.6.

Ingredienți (cm^3)	Bilirubina totală	Bilirubina directă	Martor
Ser sanguin	0,5	0,5	0,5
Reactiv cofeinic	1,75	-	1,75
Sol.NaCL 0,9%	-	1,75	-
Diazoamestec	0,25	0,25	0,25

Pentru determinarea bilirubinei directe se citește absorbanța după 5-10 minute de la adăugarea diazoamestecului, fiindcă la o expunere mai îndelungată în reacție între și bilirubina indirectă.

Pentru determinarea bilirubinei totale proba pentru dezvoltarea culorii se lasă la temperatura camerei 20 minute după ce proba se colorimetrează. La expunerea ulterioară culoarea nu se schimbă. Se citeşte absorbţia faţă de apă în cuva de 0,5 cm la 540 nm (filtru verde).

Din indicii primiţi la colorimetrarea bilirubinei totale şi directe se scad valorile martorului.

Paralel cu proba de cercetat se montează probele cu material de control (una cu conţinut normal şi alta - patologic); ele se prelucrează la fel ca şi proba de cercetat.

Calcularea rezultatelor se efectuează după curba etalon. Se determină concentraţia bilirubinei totale şi directe. Diferenţa dintre bilirubina totală şi cea directă este egală cu concentraţia bilirubinei indirecte.

Construirea curbei etalon se efectuează cu standardul de bilirubină.

Norma: bilirubina totală - 8,5 - 20 µmol/l, din care 75% revine bilirubinei indirecte.

Metoda II

Curba etalon se construieşte după setul de reactivi bilirubină - etalon liofilizat "Lahema" Cehia. Setul Bio-La-Test "Bilirubină-etalon" conţine:

1. Bilirubină liofilizată (mg/100 cm^3),
2. Albumină liofilizată.

Pregătirea soluţiilor de lucru.

Soluţie etalon de bilirubină. De pe flacon se scoate capacul de metal şi cu un ac subţire pentru injecţie se dă drumul aerului prin dopul de gumă. Apoi se înlătură atent dopul de gumă şi se adaugă 4,0 cm^3 apă distilată. Flaconaşul se astupă şi se agită atent până la dizolvarea completă a liofilizatului. Soluţia-etalon pregătită în aşa fel conţine cantitatea de bilirubină care este indicată pe eticheta flaconului (mg/100 cm^3). Soluţia de bilirubină este instabilă şi trebuie protejată de razele solare. Soluţia trebuie folosită nu mai târziu de 2 ore din momentul pregătirii.

Soluţia de albumină pentru diluţie

În flaconaşul cu albumină se introduce aer cu un ac subţire de seringă, se înlătură dopul de gumă, se adaugă 8 cm^3 apă distilată. Flaconaşul iarăşi se închide şi atent se agită, dizolvând liofilizatul. Pregătită în aşa fel soluţia pentru diluţie conţine 2 g albumină la 100 cm^3 . Soluţia se păstrează în frigider. Dacă la dizolvarea liofilizatului se formează spumă, atunci se adaugă o picătură de eter sau alcool octilic.

Pregătirea soluţiilor etalon diluate

Soluţiile etalon diluate de bilirubină pentru curba etalon se prepară în conformitate cu tabelul 2.7.

Tabel 2.7.

Nr d/r	Soluţia standard de bilirubină (μmol/l) în cm^3	Soluţia de albumină (cm^3)	Concentraţia de bilirubină (μmol/l)
1.	0,100	1,90	0,050 . a
2.	0,25	1,75	0,125 . a
3.	0,50	1,50	0,250 . a
4.	0,75	1,25	0,375 . a
5.	1,00	1,00	0,500 . a

Notă: a - concentraţia de bilirubină indicată pe eticheta flaconaşului.

Din soluţiile etalon diluate se ia câte 0,5 cm^3, se adaugă 1,75 cm^3 reactiv cofeinic şi 0,25 cm^3 diazoamestec. După 20 minute se citeşte absorbţia în aceleaşi condiţii ca şi probele de analizat.

Valori de referinţă. Bilirubina totală constituie 8,5 - 20 μmol/l. Din această cantitate 75% revine bilirubinei indirecte.

Notă:

1. Serul nu trebuie să fie hemolizat.
2. Înainte de determinarea bilirubinei, pacientul trebuie să evite folosirea medicamentelor şi alimentelor (morcov, caise, portocale) care provoacă coloraţia artificială a serului şi nu trebuie să utilizeze vitamina "C".

2.6. Determinarea activităţii α-amilazei (CE 3.2.1.1.) în materialul biologic

Dozarea activităţii alfa-amilazei în scopuri diagnostice se foloseşte pe larg în practica clinică pe parcursul a mai mult de 100 ani. În acest răstimp au fost descrise peste 300 de metode de dozare a activităţii alfa-amilazei. Ele pot fi împărţite în trei grupe mari: metodele *amiloclastice, glucoclastice şi cromogene.*

În metodele *amiloclastice* de determinare a activităţii amilazei se măsoară cantitatea amidonului scindat în urma reacţiei enzimatice, folosind principiile turbidimetrice, nefelometrice sau iodometrice. Neajunsul metodelor amiloclastice constă în heterogenitatea amidonului şi a produselor lui de hidroliză din punct de vedere a structurii chimice ceea ce creează dificultăţi la standardizarea acestor metode.

Metodele *cromogene* se bazează pe folosirea substratelor ce conţin un compus colorat legat covalent de restul glucidic. Alfa-amilaza hidrolizează substratul şi cromogenul se eliberează în stare liberă, iar cantitatea lui se determină prin fotocolorimetriere. Activitatea enzimatică se calculează reieşind din coeficientul de absorbţie a cromogenului utilizat.

Metodele *glucoclastice,* enzimatice, de dozare a alfa-amilazei se bazează pe determinarea produsului final al reacţiei - glucozei. Substratul şi enzimele care contribuie la formarea glucozei libere diferă în diferite seturi comercializate de diverse firme, dar aceste metode sunt comode la folosirea analizoarelor automate,

de oare ce ele permit folosirea microcantităților de material biologic și sunt relativ simple în realizarea lor. Însă aceste metode nu sunt lipsite de neajunsuri, condiționate de componența substratului folosit și de complexul de reacții conjugate, produsele intermediare fiind în stare să denatureze rezultatul final.

În prezent determinarea activității alfa-amilazei este unica metodă din biochimia clinică pentru care nu a fost elaborată un numai metoda de referință, dar chiar și metoda optimală de determinare a activității enzimatice; este puțin accesibil materialul stabil pentru efectuarea controlului extern de calitate.

Lipsa unui substrat unificat (standardizat), diferite mecanisme ale reacției și eterogenitatea produselor formate în urma reacției enzimatice, - toate acestea își găsesc reflectare în multitudinea procedeelor de exprimare a activității alfa-amilazei (unități amiloclastice, cromogene, etc), fapt ce creează dificultăți la confruntarea datelor, obținute prin diferite metode.

2.6.1 Determinarea activității α-amilazei în serul sanguin și urină prin metoda amiloclastică

Principiul. Se bazează pe determinarea fotometrică a scăderii concentrației de amidon în rezultatul hidrolizei enzimatice.

Reactivi:

1. Substrat-amidon. Se folosește amidon hidrosolubil uscat la temperatura de 110°C până la o masă constantă (amidon pentru colorimetric): 0,200 g amidon se trece în suspensie într-un cm^3 de apă distilată răcită, apoi se adaugă 6-7 cm^3 de apă distilată fierbinte; balonul conic se afundă într-o baie de apă clocotindă până la dizolvarea completă a amidonului și se aduce cu apă distilată la 10 cm^3. Substratul trebuie să fie transparent. Se pregătește zilnic, deoarece în el se dezvoltă rapid bacteriile și ciupercile.

2. Tampon fosfat, 0,1 M, pH-7,2 se pregătește zilnic: 72 cm^3 de sol. fosfat disodic 0,1M (17,40 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ se aduc la 1 l cu H_2O) se amestecă cu 28 cm^3 sol. de fosfat monopotasic 0,1M (13,60 g KH_2PO_4 se aduc cu apă distilată la 1 l). Soluțiile se păstrează la frigider (4-8 °C) timp de 10-15 zile.

3. Soluție de clorură de sodiu 3%.

4. Soluție de acid clorhidric 1 M.

5. Soluție de iod 0,1N. Se dizolvă 30,00 g de iodură de potasiu (KI) în 250 cm^3 de apă distilată apoi se adaugă 12,70 g de iod cristalin și se aduce volumul până la 1 l. Se păstrează în vas din sticlă brună. Soluția este stabilă.

Toți reactivii trebuie să fie de calitate analitică sau chimică și apa folosită să fie distilată, pregătită după GOST 6709-72 sau apă de puritate echivalentă.

Utilaj:

- analizor biochimic sau fotometru electronic;
- cântar analitic cu precizia de 0,0002g;
- balanță tehnică de lucru cu precizia de 0,01 g;

- baloane cotate cu volumul 100 ± 0,1 şi 1000± 0,5 cm^3 ;
- pipetă dozator cu capacitatea 10,0 ± 0,1 cm^3 ;
- pipetă dozator cu capacitatea 1,0 ± 0,005 cm^3 ;
- pipetă dozator cu capacitatea 0,100 ± 0,0005 cm^3;
- cronometru cu eroarea măsurării cel mult 0,7 s, conform DN în vigoare;
- baie cu apă.

Tehnica de lucru. 0,5 cm^3 soluţie de amidon, încălzită până la 90°C se amestecă cu 0,3 cm^3 tampon fosfat şi cu 0,1 cm^3 soluţie NaCl 3%. După 10 min de încălzire la 37 °C se adaugă 0,1 cm^3 ser sanguin sau 0,1 cm^3 de urină filtrată diluată în proporţia 1:10 sau 1:100.

Se agită minuţios şi se incubează la 37 °C timp de 30 min. Incubaţia este stopată prin adăugare de 0,1 cm^3 sol. HCl 1 M. Apoi se transferă 0,2 cm^3 din conţinutul eprubetei într-un balon cotat de 50 cm^3. Se adaugă aproximativ 40 cm^3 H_2O, 0,5 cm^3 sol. HCl 1M şi 0,1 cm^3 soluţie de iod şi se aduce la cotă cu apă distilată. Paralel se prelucrează proba martor pentru determinarea extincţiei iniţiale a amidonului introdus în amestecul de reacţie. Proba martor se efectuează ca şi cea de analizat, dar acidul clorhidric se adaugă până la incubaţie. Proba de analizat şi proba martor se măsoară imediat absorbţia la 630-690 nm (filtru roşu) în cuva de 10 mm faţă de apa distilată.

Calcularea rezultatelor se efectuează după formula:

$$\frac{Amartor - Aproba \cdot 10 \cdot 20}{Amartor} = \text{cantitatea de amidon în g}$$

hidrolizat de 1 litru de ser sanguin sau 1 l de urină la incubarea la 37°C timp de o oră, unde:

A – absorbţia;

10 – cantitatea de amidon în mg, luată în proba de analizat şi proba martor;

20 – coeficientul de calculare la 1 l de ser sanguin sau urină la 1 h de incubaţie.

La calcularea activităţii enzimei în urină rezultatul se înmulţeşte la diluţia urinei.

Valorile normale ale activităţii enzimei în serul sanguin constituie – 16-30 g/l.h , în urină până la 160 g/l.h de amidon hidrolizat.

Notă:

1. Pentru dozarea α-amilazei se recomandă de a folosi ser sanguin şi urină proaspăt colectate. Hemoliza uşoară nu influenţează asupra activităţii enzimei.

2.Amilaza se inactivează rapid la un pH < 5,0, de aceea urina acidă se va neutraliza imediat după colectare.

2. Nu se poate de folosit plasmă citrată sau oxalată de oare ce sărurile de citrat sau oxalat inhibă activitatea enzimei.

3. Intensitatea culorii soluţiei de iod-amidon depinde de temperatură. De aceea este necesar de a urmări ca temperatura să fie constantă în timpul reacţiei de culoare în probele de analizat şi martor.
4. Valorile normale ale activităţii enzimei în serul sanguin şi urină se vor controla pe donatori în fiecare laborator.

2.6.2 Determinarea α – amilazei prin metoda cinetică

Principiul. Ca substrat se foloseşte para-nitrofenilmaltoheptaozida care are avantajul de a reduce interferenţele legate de glucoza endogenă, LDH şi piruvat, precum şi a eventualelor probleme legate de instabilitatea reactivului. Două enzime indicatoare (glucoamilaza şi glucozidaza) sunt incluse în metodă cu rol în scindarea produselor de reacţie pînă la para-nitrofenol, a cărui absorbanţă se măsoară la 405 nm.
Reactivi:
-Tampon (pH 7,0)
- Reactiv blocator/enzimă.
Prepararea reactivului de lucru. Se diluează tamponul cu reactivul blocator enzimă în raport 1:2. Se agită înainte de folosire.
Material biologic. Ser, plasmă heparinată, urină.
Tehnica de lucru:
Se pipetează în eprubete:

Reactiv de lucru	1000 mkl
Se aduce la 37°C	
Ser (urină)	20 mkl

Se amestecă bine, se incubează la 37°C. Se citeşte absorbanta iniţială a probei faţă de apă sau aer, după exact un minut. Se repetă citirea după 1, 2, 3 min. Se calculează absorbanta medie pe minut (Δ A/min).Paralel cu proba de cercetat se montează probele cu material de control (una cu conţinut normal şi alta - patologic); ele se prelucrează la fel ca şi proba de cercetat.
Calcularea rezultatelor: Activitatea alfa - amilazei [U/1] = Δ A/min x 5544
Valori de referinţă:

ser	până la 95 U/l
urină	până la 380 U/l

Variaţii patologice ale amilazemiei:
Creşteri severe (de 5-10 ori valorile normale):
- pancreatită acută;
- pancreatită cronică în puseu acut;
- perturbarea eliminării urinare uremie;

Creşteri moderate:
- patologia glandelor salivare: parotidită supurativă, oreion, calcul al glandei salivare;

• afecţiuni digestive, altele decât cele pancreatice: ulcer perforat (atingere pancreatică), ocluzie intestinală, colecistită acută;
• afecţiuni pancreatice: cancer de cap de pancreas;
• diverse: cetoacidoza diabetică, sarcina extrauterină, administrări de narcotice, opioide, fenilbutazonă.

2.6.3. Determinarea α-amilazei cu folosirea 2-cloro-4-nitrofenil-maltotriozidei

Principiu. Ca substrat se foloseşte CNP-G3 (2-cloro-4-nitrofenil-maltotriozida. Alfa-amilaza hidrolizează direct substratul CNP-G3 eliberând 2- cloro-4-nitrofenolul (CNP) a cărui absorbanţă se măsoară la 405 nm.

Reactiv I (Tampon)

Tampon MES, pH 6,0	50 mmol/l
NaCl	70 mmol/l
$CaCl_2$	10 mmol/l
Activator	900 mmol/l
CNP-G3	2,27 mmol/l

Reactivii se păstrează la 2-8°C.

Tehnica de lucru

Se aduc reactivii la temperatura camerei. Se pipetează în eprubete:

Temperatura	30°	37°
Reactiv 1	1 ml	1 ml
Proba (ser)	15 mkl	25 mkl

Se amestecă şi se incubează 1 minută.Se citeşte absorbanţa după exact 1, 2 si 3 minute. Se determină ΔA/min.

Paralel cu proba de cercetat se montează probele cu material de control (una cu conţinut normal şi alta - patologic); ele se prelucrează la fel ca şi proba de cercetat.

Calcul:

Amilaza (IU/1)= Δ A/min x 4640 la 37° C

Amilaza (IU/1)= Δ A/min x 2715 la 30° C

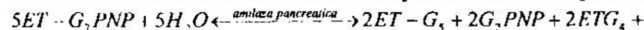
Valori de referinţă:

Temperatura	30°	37°
Ser, plasma	<67 UI/L	<86 UI/l
Urina	<369 UI/l	<470 UI/l

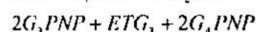
2.6.4. Determinarea amilazei pancreatice

Principiu. Ca substrat se foloseşte para-nitrofenilmaltoheptaozida (ET-G_7PNP) legată la zahărul terminal cu o grupare de blocare (etilena). Amilaza

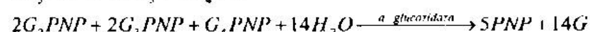
pancreatică hidrolizează substratul para-nitrofenilmaltoheptaozida (ET-G_7PNP) formând oligo-zaharide. Alfa-glucozidaza hidrolizează oligozaharid-p-nitrofenolul eliberând para-nitrofenolul a cărui absorbanță se măsoară la 405 nm. Izoenzimele salivare sunt blocate de către anticorpii monoclonali prezenți în reactivul 1.



$$5ET - G_7PNP + 5H_2O \xrightarrow{amilaza\ pancreatica} 2ET - G_5 + 2G_2PNP + 2ETG_4 +$$



$$2G_3PNP + ETG_3 + 2G_4PNP$$



$$2G_2PNP + 2G_3PNP + G_4PNP + 14H_2O \xrightarrow{a\ glucozidaza} 5PNP + 14G$$

Reactiv l (Tampon)

Tampon pH 7,1	0,1 mol/l
NaCl	50 mmol/l
MgC12	10 mmol/l
a-Glucosidază	2 μkat/l
Anticorp monoclonal	> 25 mg/l

Reactiv 2

Tampon pH 7,1	0,1 mol/l
EPS - G7	1,6 mmol/l

Reactivii sunt gata preparați. Reactivii se păstrează la 2-8°C.

Tehnica de lucru

Se aduc reactivii la temperatura camerei. Se pipetează în eprubete:

Temperatura	25°, 30°, 37°
Reactiv 1	1 ml
Proba (ser	20 mkl

Se amestecă și se incubează 2-3 minute. Se adaugă apoi 250 mkl de reactiv 2 și se agită. Se citește absorbanța după 2 minute (37°C) sau 4 minute (25°C, 30°C). Se citește din nou după exact 1, 2 și 3 minute. Se determină ΔA/min.

Paralel cu proba de cercetat se montează probele cu material de control (una cu conținut normal și alta - patologic); ele se prelucrează la fel ca și proba de cercetat.

Calcul

Amilaza pancreatică (IU/l)= Δ A/min x 15140

Factor de conversie = 15140.

2.7. Determinarea acizilor sialici în serul sanguin prin metoda Hess

Principiu. La hidroliza glicoproteinelor serului sanguin acizii sialici se eliberează și formează compuși de culoare la încălzire cu reactivul acetico-sulfuric.

Reactivi :

1. Sol. de acid tricloracetic 10%.
2. Reactiv acetico-sulfuric: 95 cm^3 acid acetic glacial și 5 cm^3 acid sulfuric concentrat;

3. Soluție standard stoc. Soluție apoasă de acid N-acetil-neuraminic 2 mmol/l: 0,06186 g acid N-acetilneuraminic cristalin se dizolvă într-un balon cotat de 100 cm^3 și se aduce cu apă distilată la semn; 1 cm^3 sol. standard stoc conține 2 μmol de acid N-acetilneuraminic.

Toți reactivii trebuie să fie de calitate analitică sau chimică și apa folosită să fie distilată, pregătită după GOST 6709-72 sau apă de puritate echivalentă.

Utilaj:

- analizor biochimic sau fotometru electronic;
- cântar analitic cu precizia de 0,0002 g;
- balanță tehnică de lucru cu precizia de 0,01 g;
- baloane cotate cu volumul 100 ± 0,1 cm^3;
- pipetă dozator cu capacitatea 10,0 ± 0,1 cm^3 ;
- pipetă dozator cu capacitatea 1,0 ± 0,005 cm^3 ;
- pipetă dozator cu capacitatea 0,100 ± 0,0005 cm^3;
- cronometru cu eroarea măsurării cel mult 0,7 s, conform DN în vigoare;
- baie cu apă.

Tehnica de lucru. La 1 cm^3 ser sanguin în eprubeta de centrifugare se adaugă 1,0 cm^3 sol. de acid tricloracetic 10%. Eprubeta se introduce în baia de apă care fierbe pe 5 minute. Proba se răcește timp de 5 minute în apă rece cu gheață. Se agită eprubeta pentru desprinderea sedimentului de pe pereți și se centrifughează 5 minute la 500 *g*. Apoi se măsoară 0,4 cm^3 de supernatant într-o eprubetă cu dop rodat, se adaugă 5 cm^3 reactiv aceto-sulfuric și timp de 30 minute se fierbe în baie. Pe urmă proba se răcește până la temperatura camerei și se măsoară absorbanța la analizor biochimic la 540 nm (filtru verde), în cuva de 1 cm față de martor. Martor - reactivul aceto-sulfuric.

Paralel cu proba de cercetat se montează probele cu material de control (una cu conținut normal și alta - patologic); ele se prelucrează la fel ca și proba de cercetat.

Calcularea rezultatelor se efectuează după curba etalon.

Construirea curbei etalon. Din soluția stoc standard de acid-N-acetilneuraminic se prepară soluții de lucru (tab.2.8).

Tabel 2.8.

Nr d/r	Soluția standard stoc de acid N-acetilneuraminic (cm^3)	Apă dist. (cm^3)	Concentrația acidului N-acetilneuraminic (μmol/l)
1.	0,10	0,30	0,0808
2.	0,15	0,25	0,1212
3.	0,20	0,20	0,1617
4.	0,25	0,15	0,2021
5.	0,30	0,10	0,2425
6.	0,40	-	0,3233

La soluţiile pregătite se adaugă 5 cm^3 reactiv aceto-sulfuric şi se prelucrează ca şi probele de analizat.

Valori de referinţă. Concentraţia acizilor sialici în ser exprimate în µmol/l a acidului N-acetilneuraminic este de 0,20 - 0,24 µmol/l.

2.8 Cercetarea crioglobulinelor şi paraproteinelor

Crioproteinele (criofigrinogen, criofibronectina, complex proteină C reactantă + albumine, crioglobuline) sunt proteine sau complexe de proteine care precipită reversibil sub temperatura de 37°C.

Crioglobulinele sunt proteine ale fracţiunii globulinice din serul sanguin, caracterizate prin faptul că preciptă spontan la temperaturi sub 37 grade C; precipitarea se produce la rece, la temperaturi de 7 - 11 grade C şi mai ales când serul se introduce în refrigerator la +4 grade C. De obicei, precipitatele de crioglobuline se redizolvă la temperatura camerei şi mai ales la 37 grade C. Unele crioglobuline pot în mod ocazional să se gelifice sau să precipite chiar la temperatura camerei.

După structura lor *crioglobulinele* pot fi:

- *tip 1,* simple, monoclonale (IgM, IgG, IgA);
- *tip 2,* mixte monoclonale (IgG +IgG, IgM+IgM);
- *tip3,* mixte, policlonale (IgG+IgM+IgA, IgG+IgM+C_1, IgM+IgG+ADN etc).

Clasificarea crioglobulinelor (CG) şi proprietăţile lor sunt expuse în tabelul 2.8.

Tabel 2.8

Clasificarea crioglobulinelor (CG) şi proprietăţile lor

Tipurile de CG şi frecvenţa lor	Caracteristica CG		
	Componenţa	Proprietăţile	Bolile în care se întâlnesc
Tip I 5 - 25%	IgM, IgG2, IgG3 monoclonale, mai rar IgA sau lanţurile uşoare ale Ig	Autoagregarea prin fragmentele Fc ale Ig	Mielomul multiplu, boala Waldenström,limfoleucoza cronică, limfoma non-Hodgkin B-celulară
Tip II 40 - 50%	IgM monoclonale, mai rar IgG, IgA monoclonale şi IgG policlonale	Componentele monoclonale posedă activitate de factor reumatoid (RF)	Hepatita virală C, alte infecţii virale, bolile autoimune, bolile limfoproliferative
Tip III 40 – 50%	Toate clasele de Ig policlonale	RF este reprezentat de obicei de IgM policlonale	Hepatita virală C, alte infecţii virale, bolile autoimune, bolile limfoproliferative

Prezenţa crioglobulinelor în serul sanguin – *crioglobulinemia* conduce la apariţia unui sindrom clinico-biologic, caracterizat prin vasculită sistemică şi/sau hipervîscozitate sanguină.

Crioglobulinemiile se împart în 2 grupe: *esenţiale, idiopatice* când etiologia nu poate fi precizată (40 % cazuri) şi *secundare* (în 60% cazuri).

Crioglobulinemiile secundare se întâlnesc în diverse patologii (tab.2.9).

Tabel 2.9

Cauzele crioglobulinemiilor secundare

- *infecţii* : - virale (HBV, v. Epstein-Barr, HIV, etc.); - bacteriene (streptococi, sifilis, endocardite infecţioase, boala Lyme); - parazitare (malarie, toxoplasmoză, echinococoză); - fungice (Coccidoidomicoză).	- *boli limfoproliferative*: - mielom multiplu; - macroglobulinemic Waldeström; - limfoame maligne; - leucemia limfatică acută
- *colagenoze /vasculite*: - poliarterita nodoasă, - poliartrită reumatoidă, - lupus eritematos sistemic, - sclerodermie; - sindrom Sjogren, boala Behcet, - purpura Henoch-Schonlein	- *boli hepatice cronice*: - hepatită cronică activă; - ciroză hepatică activă; - sarcoidoză ; - *boli autoimmune*: - tiroidită autoimună Hashimoto, - rectocolită ulcero-hemoragică

Tabloul clinic în crioglobulinemii este dominat de ***sindromul de hipervîscozitate sanguină:*** cefalee, ameţeli, tulburări de conştiinţă şi vedere, dispnee, sensibilizare la frig a extremităţilor bolnavilor manifestate sub formă de urticarie la frig sau roşcaţa extremităţilor, hemoragii cutanate şi ale mucoaselor, vasculită necrotizantă sistemică.

Semnele clinice ale crioglobulinemiei mixte esenţiale sunt reprezentate de triada Meltzer (1966) caracterizată prin roşeaţa extremităţilor inferioare, artalgii şi slăbiciune la care se adaugă glomerulonefrita şi polineuropatia periferică.

Manifestările clinice ale crioglobulinemiilor nu depind de cantitatea de CG, o cantitate relativ mică de CG pot conduce la o simptomatică clinică caracteristică.

Paraclinic crioglobulinemiile se caracterizează prin anemie normocromă, normocitară, VSH accelerat (peste 80-100 mm/h), factor reumatoid prezent în 15-28% cazuri, C_3, C_4 scăzute (cazurile cu afectare renală), evidenţierea crioglobulinelor > 100 mg/l.

Afectarea renală în crioglobulinemie apare la 30% din cazuri (atât în crioglobulinemia idiopatică cât şi în cele secundare). Leziunile sunt provocate prin complexe imune care afectează preponderent glomerulele ceea ce se manifestă prin hematurie microscopică, proteinurie, cilindrurie, C_3, C_4 scăzute, complexe imune circulante prezente.

Cercetarea crioglobulinelor se va face în toate cazurile de sensibilizare la frig a extremităţilor bolnavilor manifestate sub formă de urticarie la frig sau roşeaţa extremităţilor, la bolnavii cu hemoragii ale mucoaselor, fără cauze precise.

2.8.1. Depistarea crioglobulinelor şi criofibrinogenului

A.Proba crioglobulinică

1. Se recoltează nu mai puţin de 5 ml sânge, pe nemâncate într-o eprubetă, e de dorit să se folosească o eprubetă cu vacuum de tipul Vacutainer încălzită prealabil până la 37° C;

2. În cazul când proba colectată este transportată în laborator, ea fa fi introdusă numaidecât într-un termos cu apă cu temperatura de 37° C şi adusă în laborator pe parcursul a 60 min.

3. În laborator proba este supusă controlului preanalitic: se apreciază corectitudinea colectării şi transportării probei în laborator. Se măsoară temperatura apei din termos. Temperatura mai înaltă de 40 °C mărturiseşte că sângele a fost pus chiar de la început în condiţii nefiziologice. La temperatură mai joasă de 37 °C crioglobulinele precipită fiind incluse în componenţa cheagului de sânge, ceea ce conduce la pierderea lor ireversibilă.

4. În cazul depistării erorilor menţionate mai sus materialul nu este admis pentru cercetare.

5. După aprecierea calităţii biomaterialului proba se pune imediat în termostat la 37° C, procesul de coagulare trebuie să ocupe nu mai puţin de o oră; după coagulare se centrifughează imediat şi se decantează serul.

6. Centrifugarea se efectuează în centrifuga termostatată la **37 °C** 10 min la 1000 - 1500 tur/min. Serul se separă de cheag la temperatura de **37 °C**, se adaugă soluţie de **azid de sodiu** în concentraţia finală de 0,01%.

7. Serul (cîte 1 ml) se toarnă în 2 tuburi de sticlă cu diametrul de 5 – 6 mm, lungimea 5 6 cm şi se marchează prima eprubetă: t +4 °C, a doua eprubetă: cu t+37 °C.

8. De asemenea, se toarnă cîte 1,5 ml ser sanguin în 2 microeprubete de centrifugare tip Eppendorf cu volumul de 1,5 ml şi se marchează prima microeprubetă: t +4 °C, a doua microeprubetă: cu t +37 °C.

9. Fiecare pereche constituită din tub şi microeprubetă cu ser sanguin marcate cu t +4 °C se pun imediat în frigider la +4°C pe 7 zile.

10. Fiecare pereche constituită din tub şi microeprubetă cu ser sanguin marcate cu t +37 °C se pun imediat în termostat la +37°C pe 7 zile.

11. Serul sanguin expus la t +37 °C trebuie să fie transparent, fără sediment sau fulgi.

12. Apoi se examinează serul sanguin expus la rece la t +4 °C timp de 7 zile.

13. Dacă serul sanguin rămâne transparent, fără fulgi sau precipitat, aceasta înseamnă că crioglobulinele lipsesc, iar proba la CG se consideră negativă.

14. Proba la CG se consideră pozitivă atunci cînd se formează un precipitat, apar fulgi sau se produce gelificarea serului sanguin.

15. Precipitatul se poate prezenta sub formă de particole fine de culoare albă care sedimentează sub forma unui praf albicios pe fundul eprubetei. Când

concentraţia acestui precipitat este mare se produce o completă gelificare a serului expus la rece.

16. Dacă serul se încălzeşte până la t + 37 °C , gelificarea sau precipitatul dispare şi serul redevine clar gălbui, transparent.

17. Uneori masa gelatinoasă se formează la 30 grade C. De aceea se recomandă de a colecta sângele într-o eprubetă de centrifugare preliminar încălzită până la **37 grade C** şi de al păstra în termostat la aceeaşi temperatură **(37 grade C)** până la centrifugare.

18. Atunci când apare un precipitat, tubul de sticlă şi microeprubeta păstrate la t +4 °C se centrifughează 10 min la 1500 tur/min **la t +4 °C.**

19. Calculul conţinutului procentual al crioprecipitatului (CP) se efectuează după formula:

$$CP = \frac{precipitatul(cm)}{precipitatul(cm) + serul\ sanguin(cm)} \times 100\%$$

21. În prezenţa unor cantităţi minime de CG în tubul de sticlă şi microeprubeta păstrate la t +4 °C se observă prezenţa unor fulgi, o tulbureală sau o „îngroşare" a serului sanguin în comparaţie cu serul păstrat la t +37 °C.

22. În acest caz prezenţa CG va fi confirmată prin incubarea tubului de sticlă şi microeprubetei în termostat la t +37 °C timp de 24 ore. Dacă a doua zi fulgii, tulbureala sau „îngroşarea" serului sanguin dispar, atunci rezultatul se consideră pozitiv iar nivelul de CG va fi egal condiţionat cu 1 %.

23. Determinarea tipului de CG se efectuează prin depistarea factorului reumatoid prin metoda de aglutinare a particulelor de latex.

24. Pentru aceasta se foloseşte serul sanguin din microeprubeta păstrată la t +37 °C şi supernatantul obţinut după centrifugarea microeprubetei păstrate la t +4 °C.

25. Dacă titrul RF, depistat în serul sanguin este mai mare de cît titrul RF în supernatant, atunci aceasta înseamnă că RF întră în componenţa crioprecipitatului (CP). În continuare CP obţinut poate fi folosit pentru determinarea componenţei şi clonelor de imunoglobuline prin diverse metode imunodiagnostice, inclusiv imunoelectroforeza, imunofixaţia sau imunoblotingul.

Notă:

1. Metoda de determinarea a CG cere respectarea strictă a regimului de temperatură la toate etapele.

2. Formarea unui precipitat sau gelificarea serului la rece pot fi considerate ca fiind o crioglobulină numai dacă se redizolvă prin încălzire la 37°C.

3. A nu se confunda apariţia unui cheag de fibrină cu o precipitare de crioglobuline.

4. Dacă apare un strat albicios pe suprafaţa serului, este vorba de lipide şi nu de crioglobuline.

5. Aprecierea finală a rezultatelor se efectuează după 7 zile. Acest interval de timp este caracteristic pentru crioglobulinemiile mixte. Pentru crioglobulinemiile de tipul I este

caracterictic formarea crioprecipitatului în primele 24 - 48 ore. De ceea aprecierea preliminară a rezultatelor poate fi efectuată după trei zile. Spre deosebire de cele simple, CG mixte se întîlnesc în concentrații mai joase și de aceea ele formează crioprecipitatul pe parcursul a cîtorva zile sub formă de fulgi, precipitat sau gel.

2.8.2. Proba la criofibrinogen

Criofibrinogenemiile se întâlnesc mai rar; pentru acestea sunt carateristice procesul de precipitare în plasma sanguină

Tehnică: sângele se recoltează pe nemâncate, pe EDTA, și se centrifughează imediat. Se decantează plasma și se pune în frigider la + 4° Celsius.

Eprubeta se examinează după 1 oră, 4, 24, 48 si 72 ore pentru prezența sau absența unui precipitat sau formării unui gel. Precipitatul sau gelul format se redizolvă la 37° C dacă se datoresc prezenței unei crioproteine.

Concomitent se urmărește și serul bolnavului expus la rece. Dacă serul nu precipită la rece și precipită numai plasma, este vorba de criofibrinogen.

Notă:

1. Nu se va folosi heparina ca anticoagulant în acest test. Cantități mici de proteine precipitabile la rece se observă frecvent în plasma indivizilor normali sau la bolnavii cu stări febrile acute, când sângele se recoltează pe heparină.
2. Griofibrinogenemia poate fi asociată cu sensibilitate la rece, leziuni cutanate ischemice, purpure, tendință la epistaxis și tromboze. A fost observată la bolnavi cu tumori maligne.
3. Criofibrinogenemia primară sau idiopatică se poate întâlni rar.

2.8.3. Proba de diluție Plotner

Într-o eprubetă în care se conține 10 cm^3 H_2O distilată se picură 0,2 cm^3 ser sanguin după ce eprubeta se introduce în frigider pe 16 - 24 ore. În caz de prezență a crioglobulinelor (proba pozitivă) conținutul eprubetei devine tulbure.

2.8.4. Determinarea proteinei Bence-Jones în urină

1. O cantitate de 10 ml urină proaspătă și centrifugată se pune într-o eprubetă și se controlează pH-ul cu hârtie indicator. Dacă pH-ul este peste 5 atunci urina se aduce la pH 5 prin adaos de acid acetic diluat.
2. Eprubeta se încălzește în baie de apă până la temperatura de 60°C, și se observă dacă a apărut un precipitat în decurs de 1 minut la 60°C.
3. Apoi se adaugă peste urină un volum egal de acid sulfosalicilic 5%.
4. O parte din amestecul de urină cu acid sulfosalicilic se fierbe la flacără timp de cel puțin 2 minute și se urmărește dacă precipitatul se dizolvă complet.
5. Eprubeta se lasă să se răcească și se notează temperatura la care reapare precipitatul.

Notă:

1. Prezența proteinei Bence-Jones în urină se manifestă printr-o creștere a turbidității la circa 45°C și apariția precipitatului la 60°C, urmată de dispariția completă a precipitatului la

temperaturi ridicate de 93-100°C şi reapariţia lui la răcire lentă între 85°C până la 60°C.

2. Încălzirea urinei trebuie să se facă treptat în baia de apă timp de 15 minute. O încălzire prea rapidă poate da o reacţie falsă negativă.

3. Proteina Bence-Jones se dizolvă complet la fierbere numai dacă concentraţia acestei proteine nu este prea mare şi dacă pH-ul este între 2 şi 3. Dacă după adăugarea de acid sulfosalicilic precipitatul este foarte gros, conţinutul eprubetei se diluează cu urină normală, în aşa fel încît să dea o reacţie slabă de turbiditate şi se va adăuga acid sulfosalicilic pentru ca pH-ul să fie 3.

4. Cînd proteina Bence-Jones este însoţită şi de albuminurie, se poate separa prin centrifugare precipitatul format la 63°C. Supernatantul se aruncă, iar precipitatul format se suspendă în urină normală, şi se tratează cu un volum egal de acid sulfosalicilic şi se fierbe. Dacă precipitatul se dizolvă la fierbere, este vorba de proteină Bence-Jones.

2.9. Determinarea produselor peroxidării lipidelor şi activităţii sistemului de protecţie antioxidantă

Stresul oxidativ (SO) - această noţiune propusă de mai mulţi cercetători cuprinde toate deteriorările oxidative produse de *radicalii liberi* al oxigenului.

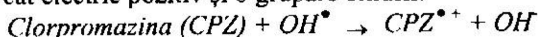
Radicalii liberi pot fi definiţi ca molecule sau fragmente moleculare ce conţin un electron impar. Se ştie că moleculele organice posedă un număr par de electroni, fiecare orbital al moleculei fiind ocupat de doi electroni cu momentul lor magnetic şi cu spini opuşi; în acest sens, radicalii liberi (RL) au următoarele proprietăţi:

a) conţin unul sau mai mulţi electroni impari. Se cunosc şi RL cu doi orbitali parţial ocupaţi;

b) pot fi neutri sau încărcaţi electric pozitiv (+) sau negativ (-). În ecuaţii, RL sunt desemnaţi cu un punct în dreapta sus: $R^\bullet$, $CH_3^\bullet$, $OH^\bullet$ sau prin primele litere din alfabet ($A^\bullet$, $B^\bullet$, $C^\bullet$);

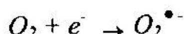
c) posedă o foarte mare reactivitate chimică, dependentă de concentraţie şi temperatură. Viteza de reacţie este atât de mare, încât în multe cazuri constanta de viteză atinge limita existentă în procesele de difuzie, $10^9\ M^{-1}s^{-1}$. În general, RL cu o structură simplă ($CH_3^\bullet$, $C_6H_5^\bullet$) au o viaţă extrem de scurtă, pe când cei cu o structură mai complexă (trifenilmetil) au o stabilitate ceva mai mare. De exemplu:

1) Clorpromazina reacţionează cu radicalul hidroxil, $OH^\bullet$ formând un radical încărcat electric pozitiv şi o grupare oxidril:



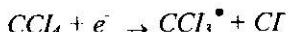
$$\text{Clorpromazina (CPZ)} + OH^\bullet \rightarrow CPZ^{\bullet +} + OH^-$$

2) Oxigenul poate capta în anumite condiţii un electron formându-se radicalul anionic superoxid, $O_2^{\bullet -}$



$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$$

3) Tetraclorura de carbon poate capta un electron rezultînd radicalul neutru electric triclormetil, $CCl3^\bullet$



$$CCl_4 + e^- \rightarrow CCl_3^\bullet + Cl^-$$

Datorită marii lor reactivităţi, RL au fost incriminaţi în foarte multe acţiuni nocive organismului. Implicarea lor în deteriorările induse de radiaţiile ionizante şi ultraviolete demonstrate în anii 60 ai secolului trecut, au condus la numeroase lucrări privitoare la modificările calitative produse de RL asupra proteinelor, acizilor nucleici şi mai ales asupra substanţelor ce conţin gruparea sulfhidril (SH), cum sunt cisteina, glutationul. În anii 70 s-a dovedit că ţinta principală a RL sunt membranele biologice celulare şi subcelulare, cu consecinţe precoce sau tardive asupra organismului.

Secretul supravieţuirii organismelor, a adaptării lor până la nivelul reglării şi inducerii RL, a formării lor în concentraţii limitate, uşor controlabile constă în găsirea şi adoptarea substanţelor antioxidante (AO). Viaţa apărută deja înaintea creşterii semnificative a O_2 în aer, nu a putut evolua decât după adaptarea la concentraţii relativ mari de O_2 prin selecţia şi incorporarea unor sisteme antioxidante, enzimatice şi nenzimatice.

Deşi structura chimică a AO este total diferită, clasificarea lor este relativ simplă (tab.2.9)

Tabel 2.9

Clasificarea antioxidanţilor naturali

ANTIOXIDANŢI:	**neenzimatici**	**naturali (vitamine C, E, carnozina, glutation)**
		sintetici (butilhidroxitoluen)
	enzimatici	**enzimatici (SOD, catalază, glutation peroxidază)**

În cazul AO naturali, neenzimatici, se mai deosebesc cei hidrosolubili, ca vitamina C (acid ascorbic) sau liposolubili ca vitamina E (tocoferol).

Marea eficienţă a AO constă tocmai în sinergismul acţiunii lor, a însumării acţiunii lor combinate, fiecare funcţionând după mecanisme diferite şi la nivele variate ale lanţului evoluţiei RL în organism, care deşi prezintă aspecte diferite ale evoluţiei RL, sugerează totuşi faptul esenţial că AO acţionează la variate nivele creând posibilitatea reglării şi limitării excesului de RL sau de specii reactive (peroxizi). În acest fel organismul şi-a creat un sistem AO variat ca structură şi mod de acţiune cu o mare redundanţă, capacitate potenţială de acţiune. Sistemele AO naturale sunt concentrate mai ales pe primul radical, $O_2^{\bullet -}$ şi pe ultimii (peroxizi), lăsând astfel descoperit radicalul hidroxil, $OH^{\cdot}$. In al doilea rând, pentru a mări eficienţa, pentru aceeaşi specie de RL acţionează AO enzimatici şi neenzimatici localizaţi în medii diferite (membrane, citoplasmă, lichide extracelulare).Un mare rol îl are conectarea sistemelor AO enzimatice cu principalele reacţii metabolice ale glicolizei, asigurând astfel o regenerare continuă a substratelor.

Un loc deosebit se acordă antioxidanților, ca sistem nespecific de prevenire al multor boli, inclusiv cancerul. Antioxidanții acționează prin menținerea mecanismelor de reglare a echilibrului oxidant-antioxidant, permițând organismului să lupte eficient m variate situații patologice, limitând leziunile și nepermițând extinderea lor. Antioxidanții acționează preventiv, limitând efectele nocive ale radicalilor liberi. Introducerea antioxidanților în terapie este în curs de cercetare clinică. Demonstrarea calităților antioxidante ale unor medicamente (de exemplu al celui mai unanim acceptat cum este aspirina) sugerează evident necesitatea implicării radicalilor liberi în medicină și în păstrarea sănătății.

Echilibrul dintre acțiunea oxidantă a RL și nivelul antioxidanților dintr-un organism este esențial vieții și caracterizează capacitatea de rezistență a unui organism. În deficite congenitale sau în multe stări patologice ce au loc într-un organism, se produce accelerarea formării RL, astfel că apare un dezechilibru între factorii pro-oxidanți și sistemele antioxidante protectoare. Așa se explică implicarea mai mult sau mai puțin a RL în diverse stări fiziologice sau patologice, în care factorii pro-oxidanți constituie un factor nespecific de agravare.

2.9.1 Dozarea compușilor cu legături duble nesaturate și a conținutului de conjugate dienice și trienice

Principiul constă în aceea că după prelucrarea materialului biologic cu amestec de hexan + izopropanol (1:1), centrifugarea probei și acidularea supernatantului cu soluție HCl pH – 2,0, faza hidro-alcoolică se prelucrează suplimentar cu KCl pulbere pentru separarea fazelor, iar conținutul relativ de compuși cu legături duble nesaturate, conjugate dienice și trienice se determină prin spectrofotometricrea fazei izopropanolice la 220, 232 și 278 nm.

Reagenți:

1. Amestec de hexan + izopropanol 1:1 și 1:2
2. Sol. HCl 0,05 M.
3. KCl cristalin.

Tehnica: Într-o eprubetă de centrigugare se introduce consecutiv 0,25 ml material biologic (ser sanguin, masă eritrocitară, homogenat tisular, sânge integru, urină etc) și 3,0 ml amestec de hexan + izopropanol (1:1), probele se ajită viguros 10-15 min. După aceea probele se centrifughează 5-7 min la 3000 tur/min. Supernatantul se toarnă în alte eprubete, se adaugă 4,0 ml amestec hexan + izopropanol (1:2) și apoi 2,0 ml soluție 0,05 M HCl pH – 2,0, se agită din nou viguros. Faza hexanolică se înlătură, iar la faza hidro-alcoolică rămasă se adaugă 1 g KCl pulbere și iarăși se agită. După separarea fazelor se măsoară absorbanța fazei izopropanolice la spectrofotometru la 220, 232 și 278 nm.

Conținutul relativ de legături duble nesaturate se măsoară la 220 nm. Conținutul relativ de conjugate dienice se măsoară la 232 nm. Conținutul relativ de conjugate trienice se măsoară la 278 nm.

Calculul se efectuează după formula:

$$Un/L = \frac{A \times V_1}{V_2} = \frac{A \times 3{,}5}{0{,}25} \times 1000 = A \times 14000$$, unde

Un/L – conținutul de compuși cu legături duble nesaturate, de diene sau triene conjugate exprimate în unități convenționale la litru;

A - absorbanța la 220, 232 sau 278 nm;

V1 – volumul fazei izopropanolice (ml);

V2 volumul de material biologic luat în probă (ml);

1000 – coeficientul de recalculare la 1 litru material biologic.

2.9.2. Dozarea dialdehidei malonice

Principiu. Produsul final al peroxidării lipidelor - dialdehida malonică (DAM) formează cu acidul tiobarbituric un complex trimetinic colorat, intensitatea căruia este direct proporțională cu concentrația DAM în proba cercetată.

Reagenți:

1. Soluție de acid tiobarbituric (ATB) 0,7%;
2. Soluție de acid ortofosforic (H_3PO_4) 1%;
3. Soluție $FeSO_4$, 0,01 M (28 mg $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ se dizolvă în 10 ml apă distilată;
4. Reagent pentru extracția complexului trimetinic (CT): 85 ml butilacetat se amestecă cu 15 ml butanol.

Tehnică. Într-o eprubetă de centrifugare se introduc succesiv 0,15 ml ser sanguin, 1,0 ml soluție de acid tiobarbituric (ATB) 0,7%, 1,5 ml soluție H_3PO_4 de 1% și 0,05 ml sol. $FeSO_4$, 0,01 M. Conținutul eprubetei se agită, se astupă cu dop de sticlă și se introduce în baia de apă clocotită pe 60 min. Ulterior proba se răcește sub un jet de apă rece, se adaugă 3 ml amestec pentru extracția CT, se agită riguros și se centrifughează 7 min la 3000 tir/min. Se măsoară absorbanța fazei organice superioare la 535 nm la spectrofotometru SF-46.

Calcul. Se efectuează după formula următoare:

$$\text{DAM } (\mu\text{mol/g prot}) = \frac{\text{Apr} \cdot 10^6 \cdot 3\text{ ml}}{\frac{1{,}56 \cdot 10^5 \cdot 0{,}15}{\text{ml} \cdot \text{x}}} = \text{Apr} \cdot 128{,}2$$

unde: Apr – absorbția probei,

3 ml – volumul fazei organice,

0,15ml – volumul omogenatului osos,

x - concentrația de proteine, g/l,

$1{,}56 \cdot 10^5\ mol \cdot cm^{-1}$ – coeficientul molar de extincție al DAM

2.9.3 Dozarea metabolitului oxidului nitric

Actualmente se consideră importantă implicarea oxidului nitric (NO) în patogenia endotoxicozei. În diverse stări patologice are loc creşterea pronunţată a nivelului de NO combinată cu majorarea producerii de anion superoxid. În urma reacţiei dintre cei doi radicali (oxidul nitric şi anionul superoxid) se formează peroxinitritul care are o acţiune citotoxică extrem de puternică.

Deoarece determinarea oxidului nitric în obiectele biologice este dificilă din punct de vedere tehnic şi economic, se propune un procedeu simplu de dozare a vitezei de producere a oxidului nitric care se bazează pe determinarea produsului final de metabolizare al oxidului nitric - nitriţilor în obiectele biologice.

În literatura de specialitate sunt descrise mai multe metode de apreciere cantitativă a metaboliţilor finali ai oxidului nitric în materialul biologic (electrochimice, fluorescente, chemiluminiscente etc.). Toate aceste metode sunt complexe şi necesită aparataj costisitor. Din aceste considerente în laboratoarele clinice se utilizează metode colorimetrice de dozare a ionului de nitrit cu reactivul Griss. Reagentul Griss nu permite determinarea ionului de nitrat, astfel, este necesară reducerea acestuia până la nitrit. Cu acest scop pot fi utilizate nitratreductaza din Aspergillus nidulans sau ionii de cadmiu sau vanadiu [6].

Principiul. Nivelul metaboliţilor NO (concentraţia sumară de nitraţi şi nitriţi) se determină prin metoda colorimetrică după intensitatea culorii reacţiei de culoare a sulfanilamidei cu ionul NO^{2-}.

Reagenţi:

*E*tanol 96 °.

Reactivul Griss - este constituit din sol. I şi sol. II.

- Sol. I – 50 mg N-naftil-etilendiamină se dizolvă în 100 ml H_2O distilată;
- Sol. II – 1 g sulfanilamidă se dizolvă în acid acetic 30%.

Ambele soluţii se păstrează la frigider la 4°C timp de câteva luni. Înaite de utilizare se amestecă soluţiile în raport de 1:1.

3. Soluţie de clorură de vanadiu (VCl_3) 0,8% - 400 mg VCl_3 se dizolvă în 50 ml 1M HCl cu filtrarea ulterioară printr-un filtru de hârtie. Se pregăteşte *ex tempore.*

Tehnică. Materialul biologic (serul sanguin) se amestecă cu etanol 96° în raport 1:2 (200 µl ser la 400 µl etanol 96°). Se centrifughează la 5000 tur/min 5 min. Ulterior la 250 µl supernatant transparent se adaugă 250 µl reactiv Griss şi 250 µl sol. 0,8 % clorură de vanadiu. Se amestecă şi se incubează 30 min la 37°C. Se măsoară absorbanţa la 540 nm.

Calcul. Cantitatea de ioni nitrit se calculează în µmol după graficul de calibrare, care se construieşte cu soluţia de $NaNO_2$, linearitatea curbei de calibrare se păstrează în diapazonul de concentraţie a ionului nitrit 5-320 µmol. Sensibilitatea metodei (concentraţia minimă depistată în probă) constituie 1,7 µmol.

Valori de referință. Conținutul sumar al metaboliților oxidului nitric, determinat prin metoda propusă în serul sanguin al persoanelor sănătoase oscilează în limitele 37,2-87,2 μmol/l.

2.9.4 Dozarea activității antioxidante totale

Principiu. Dozarea activității antioxidante totale (AAT) se bazează pe inhibiția oxidării ascorbat - și fero-induse a prooxidantului tween-80 până la dialdehida malonică.

Reagenți:

1.Sol.apoasă de tween-80 1%;.
2.Sol. $FeSO_4$ 1 mmol/l;
3. Sol.acid ascorbic 10 mmol/l;
4. Sol.acid tricloracetic (ATA) 40%;
5. Sol.acid tiobarbituric (ATB) 0,25%.

Tehnica: Într-o eprubetă de centrigugare se introduce consecutiv 0,5 ml sol. tween-80, 0,05 ml sol.$FeSO_4$, 0,05 ml sol. acid ascorbinic și 0,025 ml hemolizat (0,1 ml eritrocite spălate + 0,9 ml H_2O dist.) sau 0,05 ml plasmă sanguină. Conținutul probei se amestecă și se plasează în termostat la 40 grade Celsius pe 24 ore. După aceasta se adaugă 0,6 ml sol. ATA, iar după 60 min probele se centrifughează 10 min la 3000 tur/min. La 0,5 ml supernatant se adaugă 1,0 sol. de ATB și în continuare probele se plasează într-o baie clocotită pe 15 min, proba se răcește și se colorimetrează la 580 nm în cuve de 5 mm fața de martor.

Calculul se efectuează după formula:

$AAT = \frac{Am - Apr}{Am} \times 100$, unde Am și Apr prezintă absorbanța probelor martor și respectiv probei de control.

2.10. Metoda screening de dozare a moleculelor cu masa moleculară medie

Moleculele cu masa moleculară medie (MMM) reprezintă o grupă de substanțe de natură peptidică, cu masa moleculară în diapazonul 500 – 5000 kDa. Unele fracțiuni ale MMM posedă activitate biologică pronunțată: inhibă sinteza proteinelor și a ADN (acid dezoxiribonucleinic), provoacă imunosupresia inhibînd activitatea fagocitară și diminuând funcția limfocitelor, modifică permeabilitatea membranelor și transportul membranar, condiționează perturbarea respirației tisulare, produc o acțiune citotoxică, invocă inhibiția eritropoiezei, tulburări ale microcirculației și ale limfodinamicii. Acțiunea MMM este nespesifică.

Nivelul MMM poate fi determinat prin metada screenig (Gabrielean N.I., Lipatova B.I., 1984).
Principiu: se bazează pe spectrofotometrierea supernatantului obținut după sedimentarea proteinelor serului sanguin cu acid tricloracetic.

Reagenți:
1. Sol.acid tricloracetic (ATA) 10%.

Tehnică: într-o eprubetă de centrifugare se amestecă 0,3 ml ser sanguin cu 0,15 ml sol. 10% ATA (raportul de ingrediente 1:2). Se centrifughează 10 min la 3000 ture/min. Supernatantul se diluează 1:10 cu H_2O distilată și se măsoară absorbanța la 254 nm și 280 nm la spectrofotometru față de apa distilată. Conținutul de MMM se calculează în unități ale absorbanței.

Valori de referință: $A_{254} = 0,210 - 0,280\ (0,245 \pm 0,02)$.

$A_{280} = 0,300 - 0,380\ (0,34 \pm 0,03)$.

$$K = \frac{A_{280}}{A_{254}} = 1,3 \quad 1,6\left(1,45 \pm 10,015\right)$$

2.11. Investigații biochimice prin tehnologia uscată

Tehnologia uscata pe SLIDE-uri. Paleta de investigații biochimice s-a extins în ultimele decenii într-un ritm surprinzător datorită diversificării metodelor analitice și introducerii aparaturii automate, astfel încât s-au făcut progrese uriașe în stabilirea diagnosticului diferențial și modernizarea terapiei. Una din importantele achiziții ale metodologiei moderne în medicina de laborator este introducerea, dezvoltarea și aplicarea pe scară larga a tehnologiei de "chimie uscată" care ocupă din ce în ce mai mult un loc privilegiat prin avantajele pe care le conferă.

Deși este considerată o tehnologie relativ nouă, trebuie să menționăm că ea există deja de 30 de ani, fiind folosită în cadrul determinărilor semicantitative pe stripuri, în analiza urinei, determinări rapide de diferite teste de importanță pe sângele total, de exemplu glicemie cu stripuri. "Chimia uscată" nu se referă la interreacția în faza uscată a doi reactivi, ci necesită apa ca dizolvant intermediar Acest volum de apă este conținut în proba de analizat (sânge, plasmă, urină) care dizolvă reactivul depus în formă uscată pe o suprafață, activând în felul acesta reacția cu analitul. Modalitatea de evaluare cantitativă a probei analizate este prin spectrofotometrie de reflexie sau potențiometrie.

Pornind de la principiul fundamental al developării fotografice, KODAK a introdus pentru prima oară, în anul 1978 tehnica multistratificată pentru determinările biochimice, așa numitele „elemente analitice multistratificate (EAM)". Primele EAM elaborate au fost ureea și glicemia, însă în numai câțiva ani numărul determinărilor a crescut foarte mult.

Reacţia chimică are loc pe slide-uri (lamele pe suprafaţa cărora sunt încorporaţi reactivii în formă uscată) şi necesită o cantitate minimă de probă, de numai 10 mkl. Proba de analizat poate fi serul sau plasma sanguină şi pentru unele teste urina şi lichidul cefalorahidian. Reacţiile chimice sunt de tipul: colorimetrice, cinetice, potenţiometrice, imunoenzimatice.

La prima vedere un element analitic multistratificat (EAM) are o structură extrem de simplă: o plăcuţă de plastic alcătuită din 2 mari componente:

- o suprafaţă de polistiren care conferă rigiditate slide-ului, pentru a putea fi mai uşor manipulat în cursul efectuării analizei;
- o suprafaţă permeabilă pentru sursa de lumină peste care este aşezat reactivul.

Dacă însă v-om privi în structura intimă a unui element analitic multistratificat v-om descoperi uriaşul pas în metodologie făcut de această tehnică uscată. EAM-ul de chimie uscată este alcătuit din cel puţin 3 straturi principale (fig.2.1,a). Acestea sunt: stratul împrăştietor (de uniformizare), stratul reactiv şi stratul cromogen.

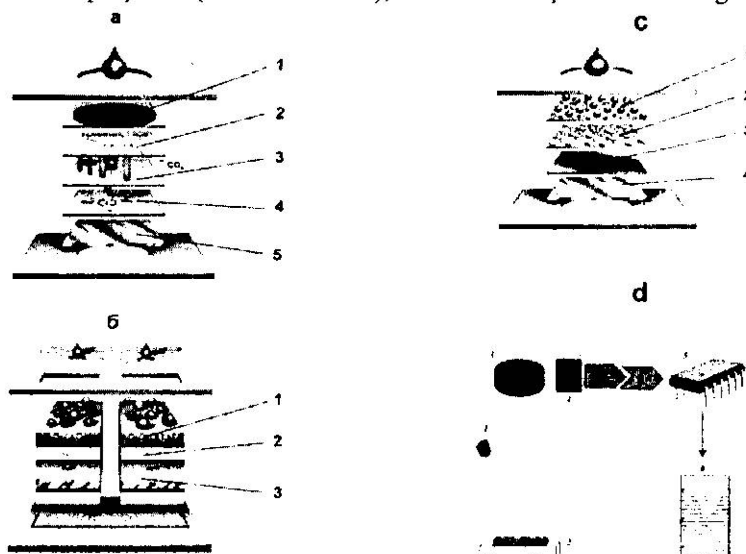


Figura 2.1

a) Element analitic multistratificat (EAM) prin spectrofotometrie de reflexie: 1 – stratul împrăştietor; 2 - stratul reactiv; 3 - membrana semipermeabilă; 4 - stratul înresgistrator; 5 - suport transparent;

b) EAM potenţiometric (2 electrozi ionselectivi uniţi printr-o punte de hîrtie): 1 - membrana ionselectivă; 2 - stratul de referinţă; 3 - electrodul Ag/AgCI;

c) EAM imunoanalitic: pentru moleculele mici – analiza imunologică competitivă; pentru moleculele mari – analiza imunologică necompetitivă: 1 - stratul de repartizare a microsferelor; 2 - stratul receptor; 3 - gelul; 4 - suport transparent.

d) Principiul de lucru al fotometrului cu reflexie: 1 – diod emiţător de lumină; 2 – suprafaţa zonei de testare; 3 – detectorul; 4 – convertizor analog-digital; 5 – microprocesorul; 6 – rezultatul.

Fiecare din aceste straturi are o funcție specială și acționează independent unul de altul, în fiecare strat putem controla condițiile fizico-chimice, cum ar fi de exemplu pH-ul, în fiecare dintre straturi poate exista o valoare diferită de pH. Acest lucru nu poate fi realizat de nici unul dintre principiile chimice umede (cu reactivi lichizi) oricât de bine elaborat și performant ar fi. În chimia umedă nu putem controla pH-ul în sensul diferențierii lui pe etape de reacție și nu putem separa în nici un fel etapele chimice ale determinării.

Stratul împrăștietor este constituit ca o "rețea" cu structură poroasă care asigură distribuirea rapidă și uniformă a probei de analizat în suprafața slide-ului, reținând componentele cu molecule mari, de exemplu lipide, hemoglobina, alte proteine, minimalizând interferențele pe care le produc aceste substanțe. Acest strat conține de asemenea o substanță de culoare albă (de exemplu TiO_2 sau $BaSO_4$), cu scopul de a reflecta lumina. Doar 10 mkl de probă sunt necesari pentru fiecare test. După spotare, proba este rapid absorbită și numai după 3 secunde slide-ul arată uscat. Proba s-a împrăștiat uniform prin slid și urmează să penetreze stratul următor. Când analitul are o structură macromoleculară și nu poate penetra stratul reactiv, reacția inițială poate avea loc chiar în stratul împrăștietor. Când proba trece prin stratul împrăștietor, realizează o interfață cu stratul reactiv, în acest moment nu poate trece bariera dintre cele două straturi. Apa din proba de cercetat inițiază o reacție de hidroliză. După ce hidroliza este completă proba, sau mai curând microfiltratul liber de proteine, trece în stratul reactiv.

Stratul reactiv conține enzime, tampoane și substanțe cu acțiune catalizatoare. Aici are loc reacția chimică propriu-zisă și produsul de reacție penetrează din nou stratul următor pentru a întâlni stratul indicator unde se formează culoarea care este citită de analizator.

În stratul reactiv se află anumite "facilități" introduse pentru a optimiza și a reduce la minim interferențele altor componente chimice.

Una dintre aceste facilități este "*scavenger layer*". Acest strat transformă substanța potențială interferentă într-un compus non interferent. Această transformare se realizează prin oxidarea compusului interferent cu ajutorul enzimelor, sau prin complexare, folosind chelatori de metale.

O altă noutate este "*masking layer*": în slide este încorporată pentru unele tipuri de reactivi această membrană folosită pentru a întări capacitățile de "mascare" ale culorii albe dispersate în stratul împrăștietor unde culoarea pigmenților (ex carotenoizi și hemoglobina), poate interfera cu lungimea de undă folosită pentru citirea unei culori a produsului de reacție.

Un exemplu în acest sens este testul pentru acid uric: 10 mkl de probă sunt spotați pe slid în stratul împrăștietor. Acesta transformă proba într-un microfilfrat de ser sau plasmă, în felul acesta se elimină tendința negativă obținută în prezența bilirubinei și o foarte crescută deviație în prezența probei hemolizate, sau a serurilor lipemice. Microfiltratul trece prin "*scavenger layer*" unde ascorbat oxidaza oxidează acidul ascorbic într-o substanță non interferentă.

O altă facilitate în eliminarea interferențelor este membrana semipermeabilă. De exemplu în cazul determinării ureei, membrana semipermeabilă este poziționată între stratul reactiv și stratul indicator. Această membrană face posibilă trecerea amoniacului produs în urma reacției cu ureaza, în stratul indicator, însă împiedică trecerea altor molecule cu potențial interferent.

EAM (slide-urile) potențiometrice (fig.2.1, b) au electrozi de Ag încorporați și sunt de unică folosință, în acest fel slide-ul însuși este o celulă cu electroliți care nu necesită decât 10 mkl de probă și 10 mkl de lichid de referință. Acest tip de determinare înlocuiește foarte bine celula de electroliți clasică a cărei întreținere necesită o procedură specială și de asemenea solicită un flux permanent de soluție în cadrul celulei.

De menționat, că tehnologia „chimia uscată" permite obținerea unor rezultate de mare acuratețe, datorită posibilității de a controla etapele procesului chimic și elimina interferențele și de aceea este o tehnologie din ce în ce mai agreată în laboratoarele de biochimie clinică și căreia îi aparține un mare viitor.

În unele forme gata pregătite pentru folosire EAM este prevăzută nu numai combinarea reagenților necesari pentru analiză în raporturile cantitative determinată de metoda dată, dar și o astfel de repartizare în spațiu într-un continuu material (cartridge, casetă), determinat de mersul procesului analitic.

Tennologia EAM a căpătat dezvoltare în câteva direcții. Una din acestea direcții este lărgirea asortimentului pentru efectuarea diferitor tipuri de cercetări. Actualmente există astfel de elemente nu numai pentru analize colorimetrice, dar și pentru investigații potențiometrice și cele bazate pe reacții imunologice competitive și necompetitive. În esență elementele analitice multistratificate

EAM reprezintă nu numai complete miniaturizate de reagenți, dar și continuumuri compacte pentru proceduri analitice, direcționate într-un anumit mod - predecesorul microchipurilor.

Folosirea largă a procedeelor de aranjare compunere a formelor gata pregătite de reagenți de unică folosință pentru efectuarea rapidă a anumitor cercetări de diferite tipuri cu detecția vizuală sau cu ajutorul riderilor speciali construiți, adică a detectorilor sau echipamentului de măsurare, progresează foarte intensiv atât în aspectul nomenclaturii cercetărilor cît și în ceea ce privește construcția casetelor. Astfel, dispozitivele miniaturizate pentru detectarea rapidă a proteinelor miocardiace troponina și mioglobina se bazează pe metoda imunocromatografică cu folosirea anticorpilor monoclonali specifici, marcați cu aur coloidal (expres-teste GLORIA –abreviatura din engleza Gold-label Optical Rapid Immuno Assay). Pe același principiu, dar cu folosirea altor anticorpi specifici și diferitor marcaje, se bazează test-sistemele pentru expres dozarea în materialul biologic a gonadotropinei horionice, depistarea dependenței la preparatele medicamentoase – benzodiazepină, opiacee, canabis, depistarea microalbuminuriei, proteinei care leagă factorul de creștere asemănător cu

insulina (proteina placentară, markerul ruperii precoce a tunicii deciduale). Test-casetele imunocromatografice au o sensibilitate suficientă. Principiul „chimiei uscate" cu unele modificări parțiale se folosesc și în coagulologie de exemplu test sistemele diagnostice pentru dozarea D-dimerilor „NicoCard" vizual după scara gradată sau cu ajutorului unui rider special. De menționat, că atenția de bază se acordă la acele teste, rezultatele cărora sunt esențiale pentru orientarea rapidă a clinicienilor în stările critice (de exemplu timpul de realizare a analizei la mioglobină, creatinfosfokinaza-MB, troponiei T în infarctul de miocard este de 15 - 20 min), și de asemenea la testele care pot fi folosite de medicii de familie sau de pacienții însăși pentru autocontrol (în diabet sau pentru stabilirea sarcinii).

Tendința spre tehnica de laborator compactă a condus la apariția biosensorilor - a dispozitivelor analitice în care în calitate de component se folosește un anumit material biologic (țesut, microorganisme, organite celulare, receptori celulari, enzime, anticorpi, acizi nucleici etc), derivații materialului biologic sau biomimeticii, care sunt cuplați la un traductor electrochimic sau microsistemă cu traductor sau integrate cu ele. Traductorul poate fi optic, electrochimic, termometric, piezoelectric sau magnetic. Cea mai avansată în acest sens este elaborarea dispozitivelor cu biosensori pentru determinarea glucozei care în acest caz îndeplinește rolul de analit model. Astăzi pe piață se comercializează nu mai puțin de 9 dispozitive de acest fel. Deosebit de promițătoare sunt rezultatele privind crearea receptorilor sintetici pentru glucoză pe baza polimerilor ce conțin acidul boronic. Se duce lucrul de creare a dispozitivelor biosensorice pentru determinarea ADN-lui, oncomarkerilor, hormonilor, virusurilor și a microorganismelor. Astfel, au fost elaborate dispozitive biosensorice lamelare pentru depistarea vizuală rapidă (~25 min) a ADN-țintelor cu limita de depistare de ordinul a 5 pmol/l sau 150 atomol/probă costul fiind nu mai mare de cît acel la efectuarea analizei obișnuite la ADN. Se preconizează transformarea acestui test într-un test cantitativ pe baza utilizării principiului de elipsometric și de asemenea folosirea elementelor biosensorice laminare în aparatele automate pentru cercetarea concomitentă a mai multor ținte.

Sunt pe calea de a fi aplicate în practica laboratoarelor clinice o noua pleadă de dispozitive de laborator clinic minituarizate, elaborate pe baza realizărilor de ultimă oră a industriei microelectronice - analizoarelor în baza microchipurilor sau sistemelor analitice micrototale. La elaborarea microcipurilor se folosesc diferite materiale - silicon, sticlă, cuarț, masa plastică, iar componentele structurale necesare pentru efectuarea procedurilor analitice se modelează prin procedeele de fotolitografie sau gravarea ionică reactivă, folosită la producerea dispozitivelor microelectronice. Componentele structurale cu dimensiuni extrem de mici (~100 nm) se obțin pe baza metodei de gravare cu raze electronice sau Roentgen. Pentru analizoarele pe microchipuri există deja o familie vastă de elemente constructive inclusiv filtre, lentile, pompe, diafragme,

electrozi ionselectivi, fotodiozi, filtre de lumină etc. Dimensiunile tip ale microchipului - 1,5 ×1,5 cm şi cu o grosime de câţiva milimetri, ceea ce corespunde aproximativ după dimensiuni cu o unghie de la degetul mare al mâinii. În prezent se efectuează asamblarea într-un complex analitic unic a câtorva microchipuri individuale fiecare din acestea fiind predestinat pentru o anumită procedură analitică. Acest complex analitic este capabil să efectuează simultan câteva tipuri de analize a materialului biologic (tab. 2.16).

Tabel 2.16

Cercetările de laborator cu folosirea microchipurilor

Cromatografia cu gaze	Analiza electro chemoluminiscentă
Dozarea gazelor sanguine	Analiza de aglutinare imunologică
Electroforeza capilară	Analiza imunoenzimatică
Spectrometria de masă cu dispersarea electrică a ionilor	Cercetarea imunologică a rezonanţei plasmonului superficial
Cercetarea celulelor: separarea, selecţia, determinarea mobilităţii, depistarea deformaţiilor, adeziunea	Cercetarea acizilor nucleici: Hibridizarea ADN, determinarea consecutivităţii nucleotidice, reacţia de polimerizare în lanţ (PCR)
Flowcitometria	PCR multiplă, PCR de transcripţie reversă
cercetarea aminoacizilor	Reacţia ligazică în lanţ
Dozarea enzimeloir	Analiza polimorfizmului lungimii fragmentelor restricţionale
Dozarea glucozei	Depistarea mutaţiilor genelor
Determinarea mobilităţii spermatozoizilor	

Dar cu aceasta perspectiva dezvoltării nu se întrerupe. Se prognozează pe viitor elaborarea nanochipurilor cu folosirea în calitate de componente de structură a unor molecule sau chiar atomi. Astfel fibrele de colagen pot servi ca cablu, molecula de ADN -- celulă de memorie analogă, proteinele membranei celulare – pompă. În pofida faptului că astfel de structuri încă nu au fost construite, se aduc exemple de autoansamblare a unor structuri moleculare, de exemplu tuburilor lipidice cu diametrul de 0,5 mkm şi lungimea de 30 mkm; tuburilor din peptide ciclice cu diametrul de 0,7- 0,8 nm. Sinteza acestor structuri care amintesc dispozitivele mecanice se consideră pot servi drept resursă pentru construirea nanochipurilor.

Tehnologiile analitice neinvazive. Aceste tehnologii capătă o dezvoltare tot mai largă în primul rând la cercetarea unor analiţi în sânge, de ex.glucoza. Unele din acestea se bazează pe folosirea spectroscopiei în diapazonul apropiat al luminii infraroşii. Spectroscopia infraroşie de transmisie dă cele mai bune rezultate la trecerea luminii prin ţesuturile care conţin puţină grăsime. Un astfel de obiect este ţesutul limbii. Spectroscopia infraroşie de reflexie în diapazonul undelor de 1050 – 2450 nm dă rezultate promiţătoare în condiţiile efectuării testului de toleranţă la glucoză.

O altă metodă este metoda fotoacustică care se bazează pe procesul de transformare în mai multe faze a energiei luminii cu laser oscilator în energia sunetului. Energia fascicolului de lumină este absorbită parțial de către sectorul iradiat de țesut, ceea ce conduce la încălzirea și mărirea volumului acestuia cu răcirea lui ulterioară și micșorarea volumului. Pulsațiile care apar în acest caz sunt detectate de către traductorul piezoelectric. Amplituda pulsației fotoacustice este direct proporțională cu energia absorbită. În experiențele in vivo a fost obținută corelația dintre determinarea glucozei prin metoda neinvazivă și în sânge cu coeficientul mai mare de 0,84. Acest tip de diapozitive neinvazive se folosește de acum în practică în special pentru monitorizarea bilirubinemiei la noi-născuți.

Este clar că aplicarea în practică a formelor analitice miniaturizate neinvazive gata pregătite, detectorilor sensibili și a dispozitivelor de măsurare, tehnologiilor neinvazive poate influența în mod substanțial și asupra organizării muncii în laborator și asupra metodelor de cercetare a materialului biologic și a procesului diagnostico-curativ, inclusiv efectuarea analizelor în afara laboratorului, fapt ce facilitează efectuarea cercetărilor de laborator nemijlocit la patul bolnavului de către personalul clinic, inclusiv medicul de familie. Este posibil că în rezultatul aplicării acestor dispozitive sfera de laborator a diagnosticului clinic și laboratoarele însăși vor obține în secolul XXI un aspect cu totul diferit și vor avea alte posibilități cu mult mai mari de cît în prezent.

Capitolul III
VALOAREA DIAGNOSTICĂ ŞI LIMITELE DE REFERINŢĂ A UNOR TESTE BIOCHIMICE

3.1 VALOAREA DIAGNOSTICĂ A DETERMINĂRILOR DE ENZIME

Aspartat aminotransferază *(AST)* se găseşte în special în ficat, miocard şi muşchii striaţi. Cantităţi mai reduse de enzimă se găsesc şi în rinichi, pancreas, plămâni şi eritrocite. La nivelul ficatului, 60% din AST este localizat în citoplasmă şi 40% în mitocondri. În normă, în serul sanguin se determină doar forma citozolică a AST, nu şi cea de provenienţă mitocondrială. AST este mai rapid metabolizată având un timp de înjumătăţire (T/2) de numai 17 ± 5 ore, pe cînd ALT are un T/2 de 47 ± 10 ore.
La persoanele adulte, activitatea AST şi ALT este mai înaltă la bărbaţi decât la femei. Până la vârsta de aproximativ 15 ani, activitatea AST este mai înaltă decât cea a ALT, cu schimbarea situaţiei către vârsta de 15 ani la bărbaţi şi 20 ani la femei cînd nivelul AST tinde a fi mai diminuat decât cel al ALT, iar după 60 ani ele devin aproape egale.

Creşteri marcate (10-100 ori)	**Creşteri moderate (2-10 ori)**
infarct de miocard	ciroză hepatică, hepatite cronice
hepatită virală	icterele mecanice
necroză toxică a ficatului	boli ale musculaturii striate
insuficienţă circulatorie cu şoc şi hipoxie	traumatisme şi intervenţii chirurgicale
	anemii hemolitice severe
	mononucleoza infecţioasă care afectează ficatul

Alaninaminotransferaza se găseşte în cantităţi mari în citoplasmă celulelor hepatice şi în cantităţi mai reduse în musculatura striată, miocard, rinichi şi pancreas.
Activitatea ALT la femeile de vârstă fertilă poartă un caracter ciclic, fiind corelată de ritmurile lunare ale hormonilor sexuali. La femeile sănătoase increţia maximală a estradiolului se constată în „vârful ovulator" (a 12-a zi de la începutul ciclului menstrual). Dinamica activităţii ALT este asemănătoare cu cea a estradiolului. În „vârful ovulator" al ciclului menstrual activitatea ALT depăşeşte valorile normale aproape de 1,5 ori. Pentru excluderea eventualelor erori la interpretarea rezultatelor nu se recomandă de a efectua dozarea enzimei în perioada „vârfului ovulator".

Creşteri marcate (10-100 ori)	**Creşteri moderate (2-10 ori)**
- hepatita virală acută	- hepatite cronice, ciroze
- necroza toxică a ficatului	- icter mecanic
	- ficatul de stază
	- insuficienţa cardiacă acută
	- mononucleoza infecţioasă

Lacticodehidrogenaza (LDH) se găseşte în cantităţi mari în muşchiul striat, ficat, miocard, rinichi şi ganglionii limfatici şi în cantităţi mai reduse în pancreas, eritrocite şi plămâni. LDH poate fi separată în cinci izoenzime. Studiul izoenzimelor arată o creştere a fracţiunilor LDH_1 şi LDH_2 în afectarea miocardului şi a fracţiunilor LDH_4 şi LDH_5 în leziunile hepatice.

Creşteri marcate (mai mult de 5 ori)	**Creşteri moderate (mai puţin de 5 ori)**
infarctul miocardic	hepatita virotică, impregnare tumorală
leziuni toxice ale ficatului	boli ale musculaturii scheletice
anemie megaloblastică	infarct pulmonar
leucemiile acute pe seama LDH_2 şi LDH_3	mononucleoza infecţioasă

talasemie, fibroză insuficienţă circulatorie cu şoc şi hipoxie infarct renal sau rejet de transplant renal	hemoliză acută accidente cerebrale limfoame maligne, sindrom mieloproliferativ

Creatinfosfokinaza (CK, CPK) se găseşte în cantităţi mari în muşchiul striat, miocard, creier. S-au evidenţiat 3 izoenzime dimerice: MM-musculară, BB- din creier şi MB – specifică miocardului

Creşteri importante	**Creşteri moderate**
infarct miocardic pe seama CK-MB distrofie musculară progresivă rabdomioliză insuficienţă circulatorie cu şoc şi hipoxie	- leziuni musculare(traume, intervenţii musculare) - injecţii i/m cu tetracicline, diazepam - - efort fizic şi crampe musculare

Glutamatdehidrogenaza (GLDH) este o enzimă mitocondrială localizată cu predominanţă în ficat, mici cantităţi se află în rinichi, plămîni, miocard . Creşteri în leziuni severe (necrotizante) ale hepatocitelor

Alfa-amilaza se găseşte în glandele salivare, pancreas, ficat, tubii Fallopi. S-au evidenţiat izoenzime pancreatice şi salivare, sinteza cărora este codificată de două gene diferite: gena *Amy*-1 este responsabilă de sinteza izoenzimei salivare (S) şi *Amy*-2 - izoenzimei pancreatice (P) a alfa-amilazei. O dovadă convingătoare a genezei pancreatice a amilazei de tipul P este lipsa acestei izoen zime la persoanele cu pancreatectomie totală. S-izoenzima alfa-amilazei este prezentă în diferite organe şi ţesuturi: tubii Fallopi, intestin, conţinutul chisturilor de ovar, laptele matern etc. Amilaza se elimină prin urină. Ponderea P-izoenzimelor în activitatea totală a alfa-amilazei este cu mult mai mare în urină, de cît în serul sanguin, posibil, din cauza diferenţelor în excreţia izoenzimelor de către rinichi. Cu toate acestea, importanţa diagnostică a determinărilor izoenzimelor alfa-amilazei în urină este mai mică de cît în sânge, fapt care ar putea fi explicat prin sensibilitatea înaltă a enzimei faţă de pH. Se ştie, că amilaza se inactivează rapid la un pH mai jos de 5,0 de aceea urina acidă trebuie neutralizată imediat după recoltare. Însă dacă urina acidă se află în vezica urinară un timp oarecare, amilaza poate fi inactivată. Este problematic faptul dacă va putea enzima să evite inactivarea în mediu puternic acid până a părăsi rinichiul.

Creşteri importante	**Creşteri moderate**
Pancreatită acută Disfuncţie severă renală Cetoacidoză diabetică severă	Parotidită Boli abdominale(ulcer perforat, colecistită acută, colici biliare) Insuficienţă renală Macroamilazemie Opiacee

Fosfatazele alcaline(FA) constituie un grup de enzime care hidrolizează fosfaţii organici la un pH alcalin. Se găseşte în ficat, oase, intestine, rinichi. La femei fosfataza alcalină poate proveni şi din glanda mamară şi din placentă. Determinările efectuate de rutină în clinică măsoară o sumă a activităţii mai multor izoenzime de provenienţă hepatică, osoasă, renală precum şi eliberate din peretele intestinal. La adulţi predomină izoenzima hepatică, la copii - cea osoasă. Activitatea FA creşte la copii între 3 – 17 ani de 2- 2,5 ori.

Creşteri	**Scăderi**
- icterul mecanic, hepatita colestatică, unele ciroze şi tumori hepatice (datorită retenţiei FA produse de epiteliul căilor biliare. Creşterile FA în afecţiunile biliare se însoţesc de o creştere a 5-	hipofosfatazie, o afecţiune osoasă cu caracter familial acondroplazie cretinism

NT şi LAP care se elimină tot prin bilă); - boli osoase asociate cu reacţie osteoblastică (osteomalacie, rahitism, hiperparatiroidism, boala Paget, sarcom osteogenic şi metastaze tumorale în oase).	mixedem deficit de vitamină C

Fosfataza acidă hidrolizează fosfaţii organici la un pH acid. Se găseşte în prostată, eritrocite, trombocite, rinichi, ficat. Enzima este instabilă. Izoenzima prostatică este tartrat inhibabilă. **Creşteri** -carcinom de prostată cu depăşirea capsulei; uneori în carcinoame mamare cu metastaze osoase.

Gama-glutamiltransferaza (gama-glutamiltranspeptidaza, gama-GT, GGT)
Enzima este localizată mai ales în rinichi, vezículele seminale, ficat, căile biliare şi pancreas şi catalizează transferul grupării gama-glutamil de pe un peptid pe un alt peptid sau pe un aminoacid. Prin acest mecanism enzima intervine în sintezele proteice şi în retroresorbţia tubulară a acizilor aminaţi din filtratul glomerular. Cea mai frecventă cauză a creşterii activităţii GGTserice este patologia hepatică. Creşteri marcate se constată în: colestază, icter mecanic, metastaze ale ficatului, hepatita alcoolică, alcoolism, administrarea barbituricilor, anticolvulsantelor şi altor medicamente ca rezultat al inducerii microzomale de enzimă.

Pseudocolinesteraza (acilcolinacil hidrolaza, PCE) este o enzimă care catalizează reacţia de hidroliză a esterilor colinei, se sintetizează în ficat fiind apoi secretată activ in plasma sanguină. De menţionat că modificările serice ale enzimelor celulare nu dau indicii asupra stării funcţionale a ficatului. Aceasta poate fi însă explorată prin urmărirea nivelului pseudocolinesterazei serice, care reflectă **funcţia proteosintetică** a ficatului.

Scăderi	**Creşteri**
- Insuficientă hepatică (hepatite, ciroze) - Ficat de stază - Denutriţie proteică, malabsorbţie - Anemii severe (mai ales megaloblastice) - Hipotiroidism sever - Reacţie de fază acută (infecţii acute, postoperator, infarct miocardic) - Impregnare tumorală - Intoxicaţii cu pesticide organofosforice - Sarcină (scădere fiziologică) - Contraceptive orale - Scăderi cu caracter genetic	-Perioada de vindecare a unei hepatite acute -Sindromul nefrotic -Hipertiroidism (fară caşexie) -Diabet cu supragreutate -Obezitate (mai ales androidă) -Hiperlipoproteinemie tip II b sau IV

Ceruloplasmina (CP) este o alfa$_2$-glicoproteină cu masa moleculară 132 kDa şi care este produsă de către hepatocitele ficatului şi epiteliocitele plămânilor; în timpul reacţiei fazei acute o sursă importantă de CP sunt monocitele. CP este principala proteină plasmatică, de culoare albastră, ce conţine 7 atomi de cupru la o moleculă, are proprietăţi oxidazice.

Funcţiile de bază ale CP	**Importanţa clinică-diagnostică**
- proteină a fazei acute a inflamaţiei; - participă la metabolismul Cu şi Fe; - antioxidant (inactivează radicalii liberi ai O_2, histaminaza serică, mieloperoxidaza); - prooxidant (catalizează oxidarea vit.C, catecolaminelor, serotoninei, compuşilor cu sulf, Fe^{++} în Fe^{+++}); - procoagulant (molecula CP are un grad înalt de	- test necesar pentru diagnosticul bolilor genetice (maladia Wilson, sindromul Menkes); - diagnosticul diferenţiat al unor forme de mielom multiplu; - urmărirea eficienţei terapiei afecţiunilor inflamatorii şi unor neoformaţiuni maligne;

omologie cu moleculele f.V şi f.VIII; CP influenţează asupra monocitelor contribuind la creşterea expresiei genei f.III tisular şi a activităţii acestuia de 70 de ori şi mai mult). – - Interacţiunea f.III cu f.VII induce activarea mecanismului exogen al coagulării plasmatice.	- aprecierea riscului apariţiei restenozelor după angioplastica vaselor coronariene în boala ischemică a miocardului; - aprecierea riscului apariţiei complicaţiilor postoperatorii şi criteriu de pronostic al evoluţiei perioadei postoperatorii în cardiochirurgie
Creşteri	**Scăderi**
— colestază hepatică — reacţia de fază acută (inflamaţii acute, postoperator, după un infarct miocardic, ictus) — la gravide, precum şi la femeile care folosesc anticoncepţionale orale de natură steroidică — melomul multiplu — melanoma — scizofrenia	— boala lui Wilson (distrofia hepato-lenticulară) — simdromul Menkes („sindromul părului răsucit") — boala Altzheimer - boli ale tractului digestiv şi ficatului (sindromul de malabsorbţie, entero-patiile cu pierderi de proteine, ciroza hepatică)

Tabel 3.1

Comportarea nivelelor serice ale enzimelor celulare în diferite forme clinice ale unor afecţiuni hepatice, în funcţie de gradul, extinderea şi viteza de instalare a leziunilor

Afecţiunile hepatice	Hepatită acută			Intoxicaţie acută (CCl_4 ciuperci)	Hepatită cronică progresivă	Ciroză hepatică activă	Ciroză hepatică "stinsă"
	anicte-rică	icterică	necroti-zantă				
ASAT	10 X	20 X	100 X	200 X	5-10 X	4-5 X	1-1,5 X
ALAT	15-20 X	30 X	80 X	160 X	5-10 X	3-5 X	1,2-1,5 X
GLDH	3-5 X	10 X	80 X	800 X	7X	3X	1
LDH	-	-	2-4 X	20 X	-	-	-
Grad de afectare a hepatocitului	moderat			sever	relativ sever	sever	sever
Număr de celule afectate	mare			mare	variabil	relativ mai redus	redus
Viteza de instalare a leziunilor	rapidă			rapidă	relativ mai lentă	relativ mai lentă	lentă
Nivelul seric al enzimelor	mult crescut			foarte mult crescut	moderat crescut	moderat crescut	puţin crescut

Notă: X - limita superioară a normalului (evaluarea numerică, dată sub formă de multipli ai limitei superioare a normalului, are doar un caracter orientativ). Activitatea serică a LDH creşte doar în cursul leziunilor severe şi rapid instalate.

Tabel 3.2

Markerii serici ai infarctului miocardic acut (IMA)

Markerul seric	Momentul la care începe să crească (ore)[a]	Valoarea maximă (ore)[a]	Durata creşterii (ore)[a]	Amplitudinea creşterii (x normal)	Specificitate (%)[b]	Sensibilitate în momentul atingerii valorii maxime (%)[b]
Troponina T	3-4	10-24	10-14 zile	6-12	80%	>98%
Troponina I	4-6	10-24	4-7 zile	6-12	95%	>98%
CK totală	4-8	24-36	36-48	6-12	57-88%	93-100%
CK-MB	3-4	15-24	24-36	16	93-100%	94-100%
CK-MB-2/ MB-1	2-4	4-6	16-24		94%	95%
Mioglobina	1-3	6-9	12-24	10	70%	75-95%
CK-MM-3/ MM-1	6	10	~2	10	70%	75-95%
Lanţurile uşoare ale miozinei	3-8	24-35	10-15		100%	63-84%
LDH[c]	10-12	48-72	11	3	88%	87%
LDH-1	8-12	72-144	8-14	5	85%	40-90%
LDH-1/ LDH-2[c]	>6		>3	5	94-99%	61-90%
AST	6-8	24-48	4-6	5	48-88%	89-97%
ALT	De obicei valori normale, cu excepţia cazurilor în care există afectare hepatică (insuficienţă cardiacă congestivă etc.)					

Notă: În tabel apar intervale de valori deoarece studiile efectuate au utilizat diferite perioade de timp scurse de la debutul simptomelor, dimensiuni diferite ale zonelor infarctate, niveluri diferite pentru stabilirea diagnosticului, diverse loturi populaţionale, diferite instrumente etc.

3.2 TESTELE METABOLISMULUI PIGMENŢILOR BILIARI

Bilirubina, componenta cea mai importantă a bilei, provine din distrugerea hemoglobinei, care are loc în sistemul macrofagal în diferite organe şi ţesuturi ale organismului, inclusiv şi în ficat.

Conversia hemoglobinei în bilirubină se face prin următoarele etape:

- desfacerea inelului tetrapirolic al hemului sub acţiunea unui sistem enzimatic denumit hemoxigenază, cu formare de *verdoglobină* sau *coleglobină* de culoare verde la nivelul sistemului macrofagal;
- pierderea fierului de către coleglobină, cu formarea *biliverdin-globinei;*
- detaşarea globinei din complexul biliverdin-globina şi eliberarea *biliverdinei*, albastră-verzuie, care este redusă de către biliverdin-reductază în ***bilirubina neconjugată (indirectă)*** *de culoare roşie.* Bilirubina neconjugată (indirectă) formată la nivelul macrofagelor trece în sânge. Ea este toxică şi insolubilă în apă, dar solubilă în lipide şi solvenţii organici. Transformarea hemului în bilirubină decurge rapid în decurs de 2-3 ore;
- în sânge bilirubina se leagă reversibil cu *albuminele plasmatice şi* este transportată spre ficat. Legarea bilirubinei de albumina poate fi inhibată de o serie de

medicamente (sulfanilamide, unele antiinflamatoare, substanțe de contrast utilizate în colangiografie, etc) și, de asemenea, de prezența în plasmă a unor cantități mari de acizi grași liberi. Aceștia determină modificări conformaționale în structura albuminei serice, având ca rezultat diminuarea capacității de legare a bilirubinei. Din motivele menționate, capacitatea de legare a bilirubinei de către albumina serică este limitată (circa 25 mg bilirubina legată în sângele unui adult). Dacă bilirubina produsă în alte țesuturi decât în ficat depășește capacitatea de transport de către sânge, ea difuzează în țesuturi.

Următoarele etape de transformare a bilirubinei neconjugate (indirecte) au loc în hepatocite:

- intrând în contact cu celula hepatică, bilirubina se detașează de albuminele plasmatice, fiind fixată de anumite proteine din membrana celulară notate Y (numită „ligandină") și Z și transportată în interiorul celulei. Prin complexarea bilirubinei de către cele două proteine este împiedicată atât ieșirea ei din hepatocite cât și pătrunderea în organitele celulare; acest din urmă aspect are o mare importanță, deoarece bilirubina inhibă respirația mitocondrială, efect complet prevenit de prezența ligandinei.
- sub influența *glucuroniltransferazei,* localizate la nivelul microsomilor celulelor hepatice, bilirubina se conjugă *cu acidul glucuronic.* Se obțin bilirubin monoglucuronidul și bilirubin diglucuronidul care la un loc poartă numele de bilirubina "conjugată". Bilirubina conjugată (directă) este hidrosolubilă și este apoi eliminată din hepatocite în canaliculele biliare printr-un mecanism de transport energodependent. Capacitatea de transport este mică în raport cu cea de conjugare, astfel încât ea se constituie ca un mecanism limitativ cu răsfrângere asupra întregului metabolism al bilirubinei.
- De menționat că, fixarea bilirubinei pe albumină și implicit menținerea ei în compartimentul intravascular, captarea selectivă în hepatocite și glucuronoconjugarea au o deosebită importanță fiziologică întrucât bilirubina neconjugată produsă în macrofage, fiind *liposolubilă*, ar putea difuza prin membranele lipoidice ale celulelor, exercitând efecte toxice în special asupra celulelor nervoase din nucleii cenușii de la baza creierului.

Etapa intestinală de metabolizare a bilirubinei:

- Eliminată în intestin, ***bilirubina conjugată*** este supusă acțiunii microflorei bacteriene. Sub acțiunea unei b-glucuronidaze bacteriene în jejun și ileon are loc hidroliza bilirubindiglucuronidului, iar bilirubina eliberată este supusă unor reacții de reducere succesive catalizate de reductaze produse tot de bacterii. Primul compus obținut prin reducere este ***mezobilirubina*** *(bilirubina + 4 H)* și apoi ***mezobilirubinagenul*** numit destul de impropiu ***urobilinogenul*** (*mezobilirubina + 4 H*), care trece apoi în ***stercobilinogen*** (*urobilinogen + 4 H).*
- *Mezobilinogenul (urobilinogenul)* format în intestin se reabsoarbe parțial prin mucoasa intestinală și pătrunde în circulația portală. Ajuns în ficat este parțial distrus până la mono-, di-, și tripiroli. O mică parte de mezobilinogen (≈

10%) este eliminată din hepatocite în canaliculele biliare şi apoi în intestin, formînd un circuit entero-hepatic.

- Cea mai mare parte a bilirubinei se elimină însă prin fecale sub formă de *stercobilinogen* care oxidându-se în stercobilină impimă scaunelor culoarea brună (cantitatea de stercobilină în decurs de 24 de ore oscilează la subiecţii normali între 50-280 mg).
- O cantitate mica din derivaţii de reducere ai bilirubinei resorbiţi în sânge prin peretele intestinal scapă ciclului entero-hepatic şi sunt excretaţi de rinichi sub formă de *urobilinogeni sau corpi urobilinici* în proporţie de 0,6 mg/24 de ore. Această cantitate creşte atunci când scade capacitatea ficatului de a capta din sânge şi de a distruge urobilinogenul, de aceea exagerarea urobilinuriei este un semn de insuficienţă hepatică.
- Principalele cauze ale *urobilinogenuriei* sunt însă reprezentate de hiperproducţia de bilirubină în cursul icterelor hemolitice şi de leziunile hepatice care limitează procesele de captare şi eliminare prin bilă a urobilinogenilor reabsorbiţi din intestin. Pe de altă parte, absenţa stercobilinogenului în fecale şi urobilinogenilor în urină indică o *obstrucţie completă* a canalului biliar.
- De menţionat, că pigmenţii biliari nu îndeplinesc careva funcţii fiziologice. Organismul se debarasează de aceştia, ca de orice produs de deşeu, excepţie făcând doar *fierul*, care este recuperat de organism pentru a fi utilizat la sinteza hemoglobinei, proces ce se desfăşoară încontinuu pe parcursul întregii vieţi.

În pofida eficienţei remarcabile a mecanismelor de captare, conjugare şi eliminare în bilă a bilirubinei, aceste mecanisme pot fi depăşite când aportul de bilirubină spre ficat este excesiv. De menţionat că suferinţa hepatocitelor perturbă mai rapid şi în mai mare măsură procesele de excreţie a bilirubinei şi de formare a fluxului biliar apos decât procesul de glucuronoconjugare.

În hepatitele virale acute anume funcţia de eliminare, excreţie este cea mai afectată, apoi se dereglează captarea, prelevarea bilirubinei de către hepatocite, iar funcţia de conjugare se afectează în ultimul rând.

Acumularea pigmenţilor biliari în sânge se soldează cu apariţia **icterului** (coloraţia galbenă a pielii, mucoaselor şi a sclerelor datorată pigmenţilor biliari), însoţit de decolorarea materiilor fecale.

Icterul devine vizibil când bilirubinemia este mai mare de 34 – 43 mkmol/l.

De menţionat că creşterea bilirubinei conjugate (hidrosolubile) produce un icter mai intens de cît aceeaşi concentraţie de bilirubină neconjugată, hidrofobă.

Cele mai mari creşteri ale bilirubinei totale se semnalează în hepatita acută virală, valoarea ei în serul sanguin putând atinge chiar 340 mkmol/l, în această boală paralelismul concentraţiei bilirubinei cu activitatea unor enzime serice (ALT, AST şi GLDH) este evident: creşterea concentraţiei bilirubinei şi a activităţii acestor enzime în perioada de 10-14 zile de la debutul bolii şi revenirea treptată la normal după 6-8 săptămâni. Dacă hepatita virală este însoţită de fenomene colestatice pronunţate, scaunele devin palide şi urobilinogenul dispare din urină

(în lipsa colestazei el este decelabil la acest nivel). Reapariția urobilinogenului în urină coincide cu reluarea fluxului biliar și reflectă începutul vindecării.

Creșterile bilirubinei în puseele hepatice cronice și în ficatul gras de etiologie alcoolică sunt rareori peste 34,2-51,3 mkmol/l; în ciroză, bilirubina totală serică variază între valoarea normală și 51,3-68,4 mkmol/l.

Testele de laborator pentru explorarea bilirubinei în diagnosticul precoce a hepatitelor acute cedează testelor enzimatice. O informație mai amplă poate fi obținută la determinarea fracțiilor bilirubinei: **neconjugate** și **conjugate** și calcularea **indicelui bilirubinic (IB),** care constituie raportul dintre fracția bilirubinei conjugate la bilirubina totală și constituie 24-25%. S-a constatat, că la sfârșitul perioadei preicterice, conținutul bilirubinei totale poate fi în limitele normei fiziologice pe când fracția conjugată se majorează.

Notă: Bilirubina neconjugată a fost numită *"indirecta"*, iar cea conjugată *"directă"*, după comportamentul în timpul reacției Van der Bergh (reacție pozitivă în prezența bilirubinei conjugate directe).

Un rol important în diagnosticul precoce al hepatitelor virale aparține *examinării urobilinogenilor* în urină. Este important de menționat că, creșterea conținutului de urobilinogeni în urină poate fi stabilită până la apariția icterului.

Examinarea stercobilinei în materiile fecale prezintă un test valoros de diagnostic. În caz de obstrucție biliară bila nu pătrunde în intestin. Lipsa stercobilinei indică începutul fazei de acolie, pe când reacția pozitivă este un indice al dispariției acoliei.

Pentru diagnosticul precoce a formelor icterice ale hepatitelor acute sunt importante determinarea în urină a *urobilinogenilor* și a *bilirubinei*, iar în sânge - creșterea *bilirubinei conjugate.* Controlul dinamic al indicilor metabolismului bilirubinei are o importanță primordială pentru depistarea sindromului colestatic, precum și diagnosticul diferențial al icterelor de diferită geneză (tabelul 3.3).

Tabel 3.3

Diagnosticul diferențiat al icterelor

Tipurile icterului	**Hiperbilirubinemia**			**Bilirubin-uria**	**Urobilino-genuria**	**Lipsa sterco-bilinei în masele fecale (acolia)**
	generală	IB≥25%	IB≤25%			
Prehepatic (hemolitic)	+	-	+	-	++	-
Hepatic (parenchimatos)	++	+	-	+	+/-	+/-
Posthepatic (obstructiv)	++	+	-	+	-	+

Notă: ++ - majorare însemnată, + - majorare moderată, +/-se depistează în diferite faze ale hepatitei viral; lipsesc; - IB - indicele bilirubinic.

3.3 Diagnosticul diferențiat al diferitor forme de icter

Tabel 3.4

Prezentare schematică a unor date de laborator utilizate în diagnosticul diferențial al icterelor

Tipul de icter	Comportarea pigmenților biliari			Alte probe de laborator	Observații
	În sînge	În fecale	În urină		
Hemolitic	Crește bilirubina neconjugată	Crește stercobilinogenul	pigmenți (bilirubina) negativi; urobilinogen pozitiv	ALT,AST, FA, GGT normale; LDH variabil. Durata de viață a eritrocitelor scăzută. De regulă reticulocite crescute	Se fac explorări complementare imunologice (autoanticorpi) și hematologice (rezistența globulară, enzime eritrocitare, hemoglobine patologice)
Colestatic	Crește bilirubina conjugată	Scaun acolitic în caz de obstrucție totală	pigmenți pozitivi; urobilinogen negativ în caz de obstrucție totală	Creșterea exprimată a FA și a GGT; creșterea ac. biliari în sânge uneori apariția lipoproteinei X	Explorări imagistice pentru evidențierea căilor biliare și a aspectului ficatului
Hepatocelular	Crește atît bilirubina neconjugată cît și cea conjugată	Parțial decolorate în cazuri cu componentă colestatică	pigmenți pozitivi; urobilinogen variabil	Probe de laborator modificate în funcție de forma clinică	Apariția icterului la un hepatic poate reprezenta un indiciu de gravitate. Se fac investigații pentru precizarea naturii hepatopatiei (alcoolică, virală, toxică etc.)

Cele mai frecvente sindroame întâlnite în patologia hepatică:

1. Sindromul de disproteinemie (inflamator nespecific). Sindromul inflamator se traduce prin creșterea gama-globulinelor (IgA, IgM și IgG), proteinelor fazei acute a inflamației existând o oarecare corelație între nivelul lor și activitatea histologică a bolii.

2. Sindromul de hepatocitoliză: creșterea transaminazelor (AST, și ALT) în perioada de stare a hepatitei virale acute B (200-300 UI/l până la 1000-3000 UI/l, față de 12-35 UI/l valori normale). În formele severe, prin distrucția masivă a celulelor hepatice, titrul ALT poate ajunge la început la valori de 1000-3000 UI/l. Sunt însă și forme de hepatită fulminantă în care determinările repetate ale

transaminazelor duc la obţinerea unor valori de zeci până la 100 de UI/l, prăbuşirea valorilor datorându-se probabil epuizării enzimatice a ficatului. Determinările altor enzime (LDH, OCT) nu este uzuală în clinica hepatitelor acute mai ales că acestea prezintă modificări şi în afectarea altor ţesuturi (muşchi, miocard, rinichi, intestin).

3. Sindrom de retenţie biliară: Creşterea concentraţiei serice a bilirubinemiei (din contul fracţiei conjugate) determină apariţia în urină a pigmenţilor biliari (bilirubina directă trecând prin filtrul renal, în timp ce bilirubina neconjugată nu se regăseşte în urină deoarece nu este solubilă). Formele colestatice de hepatită virală acută se însoţesc şi de o creştere marcată a fosfatazei alcaline prin alterarea funcţiei excretoare a ficatului, GGT, 5-nucleotidazei, leucinaminopeptidazei, precum şi de creşterea colesterolului, acizilor colici, trigliceridelor, fosfolipidelor, β-lipoproteidelor.

4. Sindromul hepatopriv (de insuficienţă hepato-celulară): pune în evidenţă scăderea capacităţii de sinteză a ficatului, ca o consecinţă a necrozei hepatice. Se cunoaşte faptul că albumina, fibrinogenul, protrombina, proaccelerina sunt proteine sintetizate exclusiv de hepatocite. Hipoalbuminemia se întâlneşte mai ales în necrozele hepatice subacute masive, în hepatitele cronice active, ciroze hepatice, fiind un indice util în prognosticul şi terapia acestor afecţiuni. În schimb, informaţiile asupra capacităţii de sinteză a protrombinei, fibrinogenului şi factorilor de coagulare V, VII şi X prin determinarea timpilor de coagulare (timp Quick, timp de protrombină, timpul de proaccelerină şi de proconvertină) orientează asupra evoluţiei şi prognosticului imediat în formele severe, precomatoase sau comatoase. Prelungirea marcată a acestor timpi se întâlneşte în necroza hepatică acută gravă (diferenţa între pacient şi martori depăşind 10-20 sau chiar 100 de secunde). O creştere moderată a timpului de coagulare (5-10 secunde) se poate întâlni şi în hepatitele B colestatice (colestaza intrahepatică prelungită împiedicând absorbţia intestinală a vitaminei K) şi în hepatitele cronice active sau cirozele hepatice AgHBs pozitiv (prin existenţa unui deficit de sinteză hepatică a acestor proteine, paralelă cu scăderea sintezei de albumină).

3.4 Indicii metabolismului proteic

Tabel 3.5

Valori procentuale şi în g/l ale fracţiunilor electroforetice ale proteinelor serice

Fracţiunea	**Valori procentuale**	**Valori în g/l**
Albumină	52-59	35,0-55,0
A1-globuline	3-5	2,5-0,35
A2- globuline	8-10	5,0-7,5
B- globuline	12-14	8,0-10,5
Gama- globuline	16-20	11,0-15,0

Tabel 3.6

Principalele proteine plasmatice şi concentraţiile lor plasmatice

Migrarea Electroforetică	Proteina	Concentraţia (g/l)
Prealbumnina	Prealbumina	0,25
Albumina	Albumina	40,0
Alfa-1	a-1- antitripsina (a-1AT)	2,80
	Apolipoproteina A (Apo A)	2,00
	a-1- glicoproteina acidă (a-1-AG)	0,90
	a-1- antichimotripsina (a-1-CT)	0,45
	Componenta C9 a sist.compl.	0,08
	Protrombina	0,05
	Factor IX	0,01
	Factor X	0,01
	a-1- microglobulina	0,05
	Transcobalamina	0,003
Inter-alfa	Vitronectina (proteina S a sist.com)	0,40
Alfa-2	A2- macroglobulina (a2-M)	2,80
	Haptoglobine (HP)	3,00
	A2- antiplasmina (a2-AP)	0,06
	Antitrombina III (AT III)	0,30
	CI- inhibitor (CI- INH)	0,24
	Kininogenul	0,10
	Ceruloplasmina	0,35
	Proteina de legare a retinolului	0,04
	Proteina de legare a tiroxinei	0,02
Beta	Apoliproteina B (Apo B)	0,90
	Transferina	2,60
	Componentul C3 al sist.compl.	0,80
	Componentul C4 al sist.compl.	0,40
	Hemopexina	0,75
	Fibronectina	0,33
	Plasminogenul	0,20
	Factor B al sist.compl.	0,08
	Factor X III	0,03
	Factor V	0,02
	Factor VIII	0,01
	B_2- microglobulina	0,001
Gamma	IgG	12,00
	IgA	2,00
	IgM	1,50
	IgD	Sub 30 mg/l
	IgE	Sub 10 mg/l
	Componentul Clq din sistemul compliment	0,15
	Proteina C reactivă (CRP)	<5mg/l

Tabel 3.7

Clasificarea proteinelor fazei acute a inflamației după gradul de creștere a concentrației

№	Grupa	Proteina	Valorile de referință (g/l)
1.	Reactanții „principali" ai fazei acute, creșterea concentrației de 20 -1000 ori în decurs de 6 – 12 ore	Proteina C reactantă(PCR) Proteina amiloidă A serică (SAA)	<0,005 0,001 – 0,030
2.	Creșterea moderată a concentrației (2 -5 ori) în decurs de 24 ore	$Alfa_1$-antitripsina $Alfa_1$-antichimotripsina $Alfa_1$-glicoproteina acidă Haptoglobina Fibrinogenul	1,4 – 3,2 0,3 – 0,6 0,4 – 1,3 0,5 – 3,2 2,0 – 3,5
3.	Creșterea neimportantă a concentrației (+20 -60%) în decurs de 48 ore	C3- compliment C4-compliment Ceruloplasmina	0,5 - 0,9 0,1 - 0,4 0,2 – 0,5
4.	Reactanții „neutri" al fazei acute, nivelul lor se menține în limitele valorilor de referință	IgG IgA IgM Alfa2-macroglobulina	8,0 – 20,0 0,9 – 4,5 0,6 – 2,5 1,2 – 3,2
5.	Reactanții „negativi" al fazei acute, manifestă o tendință de scădere a nivelului lor pe parcursul 12 -48 ore	Albumina Prealbumina Transferina Fibronectina ApoA-lipoproteina Proteina care leagă retinolul	37 – 53 0,25 – 0,45 2,3 – 4,3 <0,3 1,0 – 2,2 0,03 – 0,06

3.5 Indicii metabolismului glucidic

Tabel 3.8

Valorile de referință ale glicemiei în dependență de vârstă

Sânge ombilical	2,5 – 5,3 mmol/l	Copiii	3,3 – 5,6 mmol/l
Copiii prematuri	1,1 – 3,3 mmol/l	Adulții	4,1 – 5,9 mmol/l
Nou-născuții, prima zi	2,2 – 3,3 mmol/l	60- 90 ani	4,6 6,4 mmol/l
Nou-născuții, după prima zi	2,8 – 4,4 mmol/l	>90 ani	4,2 – 6,7 mmol/l

Tabel 3.9

Importanța diagnostică a dozării glucozei în materialul biologic

Vârsta	Materialul biologic	Intervalele de referință (normale)	Tulburarea toleranței la glucoză	Diabet zaharat (DZ)
< 50 ani	Sângele capilar și sângele venos	3,5 - 5,7 mmol/l	Până la 7,0 mmol/l	>7,0 mmol/l
	Plasma sanguină	< 6,0 mmol/l	Până la 7,2 mmol/l	> 7,2 mmol/l
>50 ani	Sângele capilar și sângele venos	4,4 - 6,2 mmol/l	Până la 7,2 mmol/l	> 7,2 mmol/l
	Plasma sanguină	< 6,6 mmol/l	Până la 7,8 mmol/l	> 7,8 mmol/l

Criteriile de compensare a DZ tip I: nivelul glicemiei a jeun şi oscilaţiile ei în timpul zilei nu depăşeşte 10 mmol/l, iar glucozuria nu depăşeşte 20-30 g în 24 ore.

Criteriile de compensare a DZ tip II sunt mai stricte: nivelul glicemiei a jeun nu trebuie să depăşească 6 mmol/l, iar oscilaţiile în timpul zilei nu vor depăşi 8,25 mmol/l; atingerea aglucozuriei.

Tabel 3.10

Caracteristica testului de toleranţă la glucoză (TTG) în normă şi la pacienţii cu DZ în dependenţă de vârstă

TTG	Până la 50 ani		După 50 ani	
	După 60 min	După 120 min	După 60 min	După 120 min
În normă	< 8,8 mmol/l	< 6,6 mmol/l	< 9,8 mmol/l	< 7,7 mmol/l
Suspect	8,8 9,9 mmol/l	6,6 – 7,7 mmol/l	< 11 mmol/l	< 8,8 mmol/l
Diabet zaharat	> 9,9 mmol/l	> 7,7 mmol/l	> 11 mmol/l	> 8,8 – 11mmol/l

Tabel 3.11

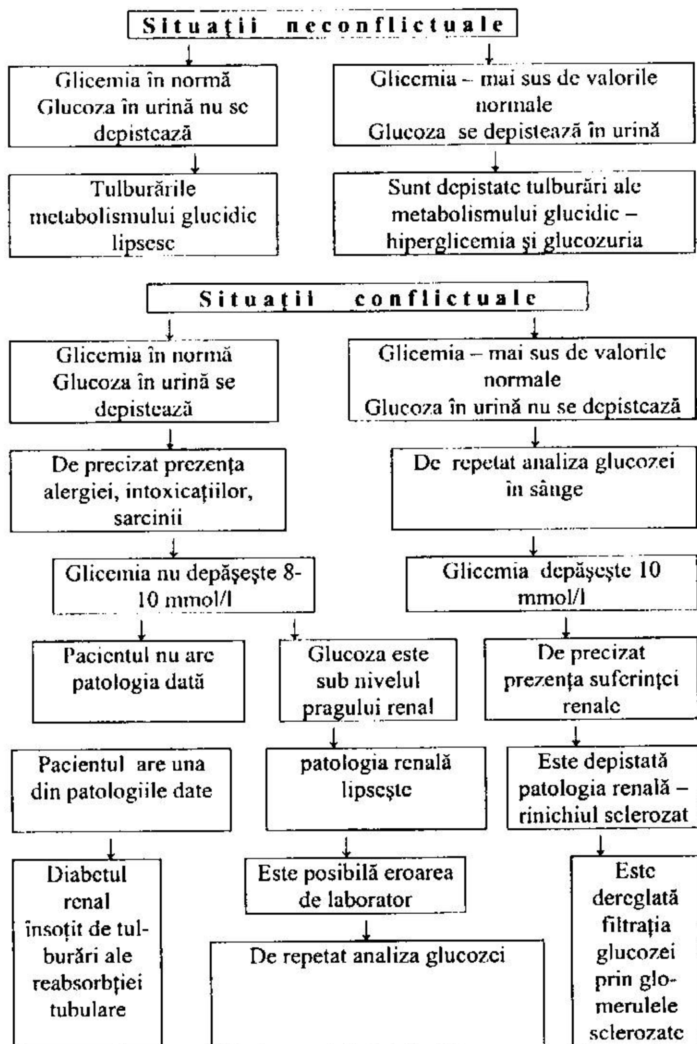
Lista indicilor de laborator folosiţi pentru diagnosticarea diabetului zaharat (DZ)

Nr/o	Testele care caracterizează tulburările metabolice	Modificările indicilor	Importanţa diagnostică
1	Dozarea glucozuriei	Depistarea glucozei în urină	Screening, diagnostic, monitoring
2	Depistarea corpilor cetonici în urină	Depistarea în urină	Determinarea gravităţii complicaţiilor
3	Dozarea glicemiei	Creşterea > 5,6 mmol/l	Screening, diagnostic, monitoring
4	TTG[1]	Peste 2 ore > 7,8 mmol/l	Diagnosticul formelor latente ale DZ
5	Hemoglobina glicată HbA_{1c}	creşterea> 5,6 mmol/l	Monitoring-ul DZ, criteriu de compensare a DZ
6	Fructozamina serică	Creşterea > 2,85 mmol/l	Monitoring-ul DZ, criteriu de compensare a DZ
7	Dozarea acizilor sialici	Creştere	Posibilitatea complicaţiilor
8	Dozarea colesterolului total	Creştere	Diagnosticul diferenţial
9	Dozarea alfa-colesterolului	micşorare	Diagnosticul diferenţial
10	Dozarea trigliceridelor	Creştere	Diagnosticul diferenţial
11	Dozarea seromucoizilor	Creştere	Posibilitatea complicaţiilor
12	Dozarea acidului lactic	Creştere	Posibilitatea complicaţiilor
13	Dozarea acidului piruvic	Creştere	Posibilitatea complicaţiilor
14	Determinarea parametrilor EAB[2]	Micşorarea pH ului, deficitul bicarbonaţilor, bazelor tampon	Diagnosticarea acidozei

Notă: TTG - testul de toleranţă la glucoză

Tabel 3.12

Situaţiile conflictuale la dozarea glucozei în sânge şi căile de soluţionare



3.6 Indicii metabolismului lipidic

Tabel 3.13

Caracteristica şi funcţiile apoproteinelor

Apoproteina	Masa moleculară (kDa)	Concen-traţia plasmatică medie (mg/l)	Clase de lipoproteine în care se depistează	Funcţia
Apo A-I	28,3	1600	HDL, chilomicroni	Activarea LCAT, transportul lipidelor, ligand pentru receptorul HDL
Apo A-II	17,0	350	HDL, chilomicroni	Cofactor pentru lipaza hepatică, ligand pentru receptorul HDL
ApoA-IV	46,0	150	Chilomicroni, HDL, VLDL	Activarea LCAT, ligand pentru receptorul HDL
Apo B-100	549,0	800	VLDL, IDL, LDL	Ligand prin care VLDL şi LDL sunt captate de receptorii celulei, transportul lipidelor din ficat
Apo B-48 (B_L)	260,0	urme	Chilomicroni	Ligand pentru captarea resturilor de chilomicroni, transportul lipidelor din intestinul subţire
Apo C-I	6,3	70	Chilomicroni, VLDL, HDL	Activatorul LCAT
Apo C-II	8,8	40	VLDL, HDL, Chilomicroni	Activatorul LPL
Apo C-III	8,8	130	Chilomicroni, VLDL,HDL	Inhibitorul activităţii LPL, întârzie captarea resturilor de chilomicroni
Apo D (CeEP)*	35,2	60	HDL-3	Transfer al esterilor de colesterol din HDL spre LDL şi VLDL
Apo E	37,0	50	Chilomicroni, VLDL, HDL	Ligand pentru captarea lipoproteinelor de către receptorii celulari

Notă: Toate apoproteinele participă la menţinerea structurii şi respectiv solubilităţii lipoproteinelor.

* CeEP - proteina de transfer a esterilor de colesterol (cholesterol ester exchange protein)

LCAT - lecitin: colesterol aciltransferază; LPL - lipoproteinlipază.

VLDL – lipoproteinele cu densitate foarte joasă; LDL - lipoproteinele cu densitate joasă; HDL - lipoproteinele cu densitate înaltă.

Tabel 3.14

Caracteristica lipoproteidelor

Proprietăți	CM	VLDL	IDL	LDL	HDL
Densitatea	0,95	0,96-1,006	1,007-1,019	1,02-1,063	1,064-1,21
Diametrul(nm)	100-1000	43	27	22	8
Mobilitatea electroforetică	Rămîn la start	Pre-beta	Beta-flotante	Beta	Alfa
Locul formării	Intestin	Ficat	Catabolismul VLDL	Catabolismul VLDL prin IDL	Ficat, intestin, catabolismul CM și VLDL
Funcția de bază	Transportul TG exogene	Transportul TG endogene	Predecesorul LDL	Transportul colesterolului	Transportul în revers al colesterolului
Componența					
TG	90%	65%	20%	5%	5%
Colesterol	5%	15%	25%	50%	20%
Fosfolipide	4%	10%	35%	25%	25%
Proteine	1%	10%	20%	20%	50%
Apoproteine	A, B-48, C, E	B-100, C, E	B-100, E	B-100	A, C, E

Tabel 3.15

Interpretarea unor parametri ai lipidelor și lipoproteinelor serice în sensul riscului pentru dezvoltarea bolilor cardiovasculare

	Risc redus	Risc mediu	Risc crescut
Bărbați	HDL > 1,4 LDL< 3,4	HDL 0,9 – 1,4 LDL 3,4 - 4,1	HDL < 0,9 LDL> 4,1
Femei	HDL > 1,7 LDL< 3,4	HDL 1,2 -1,7 LDL 3,4 - 4,1	HDL< 1,2 LDL> 4,1

Tabel 3.16

Nivelele țintă ale indicilor lipidogramei (datele Asociației Europeene a Inimii)

Parametrii lipidogramei	Profilactica primară*	Profilactica secundară**
Colesterol total, mmol/l	<5,2	<5,0
LDL-colesterol, mmol/l	<3,5	<3,0
HDL-colesterol, mmol/l	> 1,1	> 1,1
Trigliceride, mmol/l	<2,0	<2,0

Notă: *- Profilactica primară este orientată spre micșorarea riscului apariției bolilor cardio-vasculare la pacienții cu factori de risc.

** - Profilactica secundară micșorează frecvența bolilor cardio-vasculare la pacienții cu sindrom coronarian acut, cardioscleroză postinfarct, după șuntarea aorto-coronariană, angioplastică.

Tabel 3.17

Criteriile de dezvoltare a complicaţiilor vasculare la pacienţii cu diabet zaharat tip 2 (Grupul de experţi europeni pentru studierea diabetului zaharat, 1998)

Parametrii lipidogramei	Risc redus	Riscul macroangiopatii	Riscul microangiopatii
Colesterol total, mmol/l	<4,8	4,8 - 6,0	>6,0
LDL-colesterol, mmol/l	<3,0	3,0 - 4,0	>4,0
HDL-colesterol, mmol/l	> 1,2	1,0 – 1,2	<1,0
Trigliceride, mmol/l	<1,7	1,7 – 2,2	>2,2

Tabel 3.18

Nivelele ţintă ale indicilor de laborator la pacienţii trataţi cu statine

Parametrii de laborator	Valorile ţintă
Colesterol total	Pînă la 5,0 mmol/l
LDL-colesterol	Pînă la 3,0 mmol/l
HDL-colesterol	> 1,2 mmol/l
Trigliceride	Pînă la 2,0 mmol/l
ASAT	<35 UI/l
ALAT	<40 UI/l
Creatinfosfokinaza (CFK)	B.<370 UI/l F.<285 UI/l
Proteina C reactantă	<4 mg/l
Homocisteina	<15 mkmol/l

Tabel 3.19

Compoziţia în electroliţi a plasmei şi a lichidului interstiţial în comparaţie cu cea a lichidului intracelular în mmol/1.

	Plasmă	Lichid interstiţial	Lichid intracelular**
Na^+	145	148	20
K^+	4	4	158
Ca^{++}	2,5	1,0-1,5	1,6
Mg^{++}	1,0	0,5-1,0	15,0
Total cationi	153	153	195
Cl^-	103	116	2
$HC0_3^-$	28	31	8
Proteine	17	-	55
Alţi anioni	5	6	130
Total anioni	153	153	195
Total electroliţi	306	306	390***
Osmolaritate	292 (282-300)****	294,6****	294,6****

*Notă:** - Aproximativ jumătate din calciul plasmatic şi cam un sfert din magneziul plasmatic se găsesc sub formă legată de proteine (neionizată şi nedifuzibilă).

** - Compoziţia lichidului intracelular variază de la ţesut la ţesut. De exemplu K^+ este mai scăzut în hematii decât în musculatură, pe când Cl^- practic nul în musculatură, poate totuşi pătrunde în hematii.

*** - Suma anionilor şi cationilor din celule depăşeşte pe cea din plasmă sau din lichidul interstiţial, dar o bună parte a acestor electroliţi este inactivă osmotic fiind legată de proteine sub formă nedisociată.

**** - Valorile osmolarităţii în mmoli este cu ceva mai redusă decât cea obţinută prin calcul (suma anionilor şi cationilor), datorită interacţiunii dintre ioni (precum şi prezenţei proteinelor care reduc activitatea osmotică a unor electroliţi. Variaţii ale valorilor osmolarităţii plasmei se datorează tocmai diferenţelor în conţinutul de proteine al lichidelor examinate.

Tabel 3.19

Comportarea principalilor parametri ai echilibrului acido-bazic (EAB) şi electrolitic în diferite stări patologice

Tipurile de dereglări	Parametrii EAB					Electroliţii, mmol/l				Acidul lactic, mmol/l
	pH	pCO_2	BE	BB	SB	Cl^-	Na^+	K^+	HCO_3^-	
Acidoza metabolică	<	<	<	<	<	>	≥	>	<	>
Acidoza respiratorie	<	>	≥	≥	>	<	>	>	>	≤
Valori normale	**7,35 - 7,45**	**35-45**	**±2,5**	**46-52**	**21-27**	**95 - 110**	**135-153**	**3,8-5,0**	**24-28**	**0,9-1,9**
Alcaloza metabolică	>	≥	>	>	>	<	≤	<	>	<
Alcaloza respiratorie	>	<	≤	<	<	>	<	<	<	≥

ÎNCHEIERE

Laboratorul de diagnostic clinic ocupă în medicina practică un loc din ce în ce mai important, el fiind considerat pe bună dreptate drept sursa informaţională medicală de bază. În cadrul Laboratorului de diagnostic clinic se constituie tot mai mult o ramură de sinestătătoare – biochimia clinică care prezintă posibilităţi de determinare exactă a parametrilor biochimici din materialul biologic analizat şi cu ajutorul cărora se precizează sau se completează diagnosticul, se stabileşte terapia cea mai adecvată în cel mai scurt timp şi se urmăreşte evoluţia bolnavului.

Între medicina clinică şi Laboratorul de diagnostic clinic trebuie să se realizeze o reală simbioză prin prelungirea explorării clinice cu mijloace tehnice moderne de laborator, în vederea realizării multiplelor probleme medicale pe care le ridică bolnavul şi boala.

Medicii de laborator sunt acei ce trebuie să cunoască bine tehnica de executare a analizelor şi să sesizeze că o valoare a unui constituent biochimic întră în domeniul patologului.

Medicii clinicieni trebuie să aibă în vedere indicaţiile analizelor de laborator, interpretarea acestora, precum şi supravegherea corectă a recoltării produselor biologice de la bolnav, deoarece de acest lucru în mare măsură depinde corectitudinea rezultatelor emise de către laborator.

Considerăm că lucrarea de faţă este un început în ceea ce priveşte integrarea învăţământului superior cu practica medicală, scopul fiind ca viitorul medic să poată cunoaşte cât mai multe din aspectele moleculare ale stării normale şi patologice ale organismului uman.

Încheiem aici cu observaţia că aplicarea în practica de laborator a cunoştinţelor din domeniul biochimiei clinice este în continuă expansiune.

Credem că în următoarele decenii vom fi martorii unor realizări impunătoare referitoare la acest compartiment deosebit de important al medicinii de laborator.

Bibliografie

1. Cristea-Popa Elena, Popescu Aurora, Truţia E. Tratat de biochimie medicală, vol I. Ed. medicală, Bucureşti, 1991
2. Cucuianu M., Crîsnic I., Luminiţa Pleşca-Manca. Biochimie clinică. Ed.Dacia, Cluj-Napoca, 1998, 368 p.
3. Mirande K.M., Espez M.Q., Wink D.// Nitric Oxide: Biol.Chem. – 2001, v.5, p. 6-71.
4. Marşall V. Biochimie clinică p.90-106.
5. Ordinul Ministerului Sănătăţii al Republicii Moldova nr.517 din 14.12.2006 "Despre activitatea serviciului de laborator şi măsurile de perfecţionare".
6. Виноградов Н.А.// Клиническая медицина – 2001. - N11, стр. 47-51;
7. Горячковский А.М. "Справочное пособие по клинической биохимии", Одесса,
8. Инструкция по применению унифицированных клинических методов исследования. Москва, 1986. С.107-133.
9. Колб В.Г., Камышников В.С. "Справочник по клинической химии", Минск, Беларусь, 1982 г.
10. Kostiuc V.A., Potapovici A.I., Lunets E.F. Spectrofotometriceskoe opredelenye dienovyh konjugatov // Vopr.med.chimii, 1984, Nr.4, p.125-127].
11. "Лабораторные методы исследования в клинике", Справочник. Под ред. Меньшикова В.В., М., Медицина,1987 г.
ОКФА, 1994.
12. Назаренко Г.И., А.А.Кишкун Клиническая оценка результатов лабораторных исследований стр.357-362.
13. Ошибки в лабораторной диагностике. Под ред.проф.Л.Л.Громашевской. Киев, «Здоровья», 1990, стр.54-63.
14. Приказ МЗ СССР № 290 от 11.04.1972 г. "Об унификации клинических лабораторных методов исследования".
15. Приказ МЗ СССР № 960 от 15.10.1974 г. "Об унификации клинических лабораторных методов исследования"
16. Приказ МЗ СССР № 1175 от 21.11.1979 г. "Об унификации клинических лабораторных методов исследования"